

Docket No.: 61352-045

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

| | | |
|-------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| In re Application of | : | Customer Number: 20277 |
| | : | |
| Hiddenobu YAKU, et al. | : | Confirmation Number: |
| | : | |
| Serial No.: | : | Group Art Unit: |
| | : | |
| Filed: October 01, 2003 | : | Examiner: |
| | : | |
| For: | | METHOD FOR DETECTING EXTENSION REACTION WITH PRIMERS, METHOD FOR DISTINGUISHING KIND OF BASES, APPARATUS FOR DISTINGUISHING KIND OF BASES, APPARATUS FOR DETECTING PYROPHOSPHATE, METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACID, AND TIP TO MOUNT SAMPLE SOLUTION |

**CLAIM OF PRIORITY AND
TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT**

Mail Stop
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

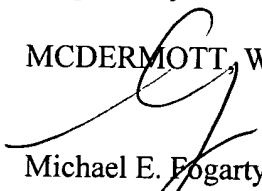
Sir:

In accordance with the provisions of 35 U.S.C. 119, Applicants hereby claim the priority of:

Japanese Patent Application No. 2002-288837, filed October 1, 2002

A Certified copy is submitted herewith.

Respectfully submitted,


MCDERMOTT, WILL & EMERY

Michael E. Fogarty
Registration No. 36,139

600 13th Street, N.W.
Washington, DC 20005-3096
(202) 756-8000 MEF:prg
Facsimile: (202) 756-8087
Date: October 1, 2003



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

6352-045
YAKU et al.
October 1, 2003
McDermott, Will & Emery

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 1 0 月 1 日

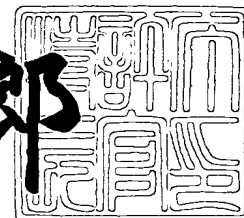
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 2 8 8 8 3 7
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 8 8 8 3 7]

出 願 人
Applicant(s): 松下電器産業株式会社

2 0 0 3 年 7 月 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 5 4 9 4 3

【書類名】 特許願
【整理番号】 2033840123
【提出日】 平成14年10月 1日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12Q 1/06
C12Q 1/34

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 夜久 英信

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 行政 哲男

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077931

【弁理士】

【氏名又は名称】 前田 弘

【選任した代理人】

【識別番号】 100094134

【弁理士】

【氏名又は名称】 小山 廣毅

【選任した代理人】

【識別番号】 100110939

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 宏

【選任した代理人】

【識別番号】 100110940

【弁理士】

【氏名又は名称】 嶋田 高久

【選任した代理人】

【識別番号】 100113262

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 祐二

【選任した代理人】

【識別番号】 100115059

【弁理士】

【氏名又は名称】 今江 克実

【選任した代理人】

【識別番号】 100115510

【弁理士】

【氏名又は名称】 手島 勝

【選任した代理人】

【識別番号】 100115691

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 篤史

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014409

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0006010

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ピロリン酸の測定方法、ピロリン酸測定装置、核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法、塩基種判別装置、核酸の検出方法および試料溶液導入チップ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 H^{+} -ピロホスファターゼを保持し且つ H^{+} を通しにくい膜によって区画された第 1 領域および第 2 領域のうち、上記第 1 領域にピロリン酸を含む第 1 溶液を、上記 H^{+} -ピロホスファターゼに上記第 1 溶液が接触するように貯留させるとともに、上記第 2 領域に第 2 溶液を貯留させる工程 (a) と、

上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方の H^{+} 濃度の変化を測定する工程 (b) とを含み、

上記 H^{+} -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第 1 領域に露出していることを特徴とするピロリン酸の測定方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のピロリン酸の測定方法において、

上記膜は、もう 1 つの H^{+} -ピロホスファターゼを保持しており、

上記もう 1 つの H^{+} -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第 2 領域に露出しており、

上記第 2 溶液のピロリン酸の濃度は、上記第 1 溶液のピロリン酸の濃度よりも低いことを特徴とするピロリン酸の測定方法。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載のピロリン酸の測定方法において、

上記工程 (b) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方の H^{+} 濃度の変化を、光学的に測定することを特徴とするピロリン酸の測定方法。

【請求項 4】 請求項 3 に記載のピロリン酸の測定方法において、

上記工程 (a) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方に、pH 感受性色素または膜電位感受性色素が添加されていることを特徴とするピロリン酸の測定方法。

【請求項 5】 請求項 4 に記載のピロリン酸の測定方法において、

上記工程 (a) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方に、アクリジンオレンジまたはオクソノール V が添加されていることを特徴とするピロ

リン酸の測定方法。

【請求項 6】 請求項 1 または 2 に記載のピロリン酸の測定方法において、
上記工程 (b) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方の H^+
濃度の変化を、電氣的に測定することを特徴とするピロリン酸の測定方法。

【請求項 7】 容器と、
上記容器内に設けられた内部槽と、
上記容器内を、溶液を貯留するための上記内部槽の内部領域と外部領域とに区
画する、 H^+ を通しにくい膜と、
上記内部槽の上記外部領域に貯留される溶液に接触するように設けられた電極
と、
上記内部槽の上記内部領域に貯留される溶液に接触するように設けられた H^+
感受性電極とを備え、
上記膜には、 H^+ -ピロホスファターゼが、そのピロリン酸を加水分解する活
性部位を上記外部領域に露出するように保持されていることを特徴とするピロリ
ン酸測定装置。

【請求項 8】 核酸と、上記核酸に相補的に結合する相補結合領域を含む塩
基配列を有するプライマーとを含む溶液を調製し、上記プライマーの伸長反応を
行なうことによって反応溶液を調製する工程 (a) と、

H^+ -ピロホスファターゼを保持し且つ H^+ を通しにくい膜によって区画された
第 1 領域および第 2 領域のうち、上記工程 (a) においてプライマーの伸長反応
が生じた場合に生成するピロリン酸を含む上記反応溶液から調製された第 1 溶液
を、上記 H^+ -ピロホスファターゼに上記第 1 溶液が接触するように貯留させる
とともに、上記第 2 領域に第 2 溶液を貯留させる工程 (b) と、

上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を測定する
工程 (c) とを含み、

上記 H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記
第 1 領域に露出していることを特徴とする核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法
。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法にお

いて、

上記膜は、もう 1 つの H^+ -ピロホスファターゼを保持しており、

上記もう 1 つの H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第 2 領域に露出しており、

上記第 2 溶液のピロリン酸の濃度は、上記第 1 溶液のピロリン酸の濃度よりも低いことを特徴とする核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法。

【請求項 1 0】 請求項 9 または 1 0 に記載の核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法において、

上記工程 (c) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を、光学的に測定することを特徴とする核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法。

【請求項 1 1】 請求項 1 0 に記載の核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法において、

上記工程 (b) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方には pH 感受性色素または膜電位感受性色素が添加されていることを特徴とする核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法。

【請求項 1 2】 請求項 1 1 に記載の核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法において、

上記工程 (b) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方にはアクリジンオレンジまたはオクソノール V が添加されていることを特徴とする核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法。

【請求項 1 3】 請求項 9 または 1 0 に記載の核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法において、

上記工程 (c) における上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を、電氣的に測定することを特徴とする核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法。

【請求項 1 4】 プライマー伸長反応に必要な温度調節を行なう反応部と、ピロリン酸を測定するピロリン酸測定部とを備え、

上記ピロリン酸測定部は、プライマー伸長反応により生じるピロリン酸を含む

第1溶液を、 H^+ -ピロホスファターゼを保持し且つ H^+ を通しにくい膜によって区画された第1領域および第2領域のうち、上記第1領域に上記 H^+ -ピロホスファターゼに上記第1溶液が接触するように貯留させ、上記第2領域に第2溶液を貯留させた後、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を測定することを特徴とする塩基種判別装置。

【請求項15】 請求項14に記載の塩基種判別装置において、

上記反応部は、試料溶液を導入するための試料溶液導入チップを挿入可能なスロットを有することを特徴とする塩基種判別装置。

【請求項16】 請求項14または15に記載の塩基種判別装置において、

上記反応部と上記ピロリン酸測定部とを制御し、測定結果を解析する解析手段をさらに備えることを特徴とする塩基種判別装置。

【請求項17】 特定の塩基配列を有する核酸に相補的に結合するプライマーを含む溶液を調製し、上記プライマーの伸長反応を行なうことによって反応溶液を調製する工程（a）と、

H^+ -ピロホスファターゼを保持し且つ H^+ を通しにくい膜によって区画された第1領域および第2領域のうち、上記工程（a）においてプライマーの伸長反応が生じた場合に生成するピロリン酸を含む上記反応溶液から調製された第1溶液を、上記 H^+ -ピロホスファターゼに上記第1溶液が接触するように貯留させるとともに、上記第2領域に第2溶液を貯留させる工程（b）と、

上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を測定する工程（c）とを含み、

上記 H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第1領域に露出していることを特徴とする核酸の検出方法。

【請求項18】 請求項17に記載の核酸の検出方法において、

上記膜は、もう1つの H^+ -ピロホスファターゼを保持しており、

上記もう1つの H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第2領域に露出しており、

上記第2溶液のピロリン酸の濃度は、上記第1溶液のピロリン酸の濃度よりも低いことを特徴とする核酸の検出方法。

【請求項 19】 請求項 17 または 18 に記載の核酸の検出方法において、
上記工程 (c) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方の H^+
濃度の変化を、光学的に測定することを特徴とする核酸の検出方法。

【請求項 20】 請求項 19 に記載の核酸の検出方法において、
上記工程 (b) において、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方に
は pH 感受性色素または膜電位感受性色素が添加されていることを特徴とする核
酸の検出方法。

【請求項 21】 請求項 20 に記載の核酸の検出方法において、
上記工程 (b) において、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方に
はアクリジンオレンジまたはオクソノール V が添加されていることを特徴とする
核酸の検出方法。

【請求項 22】 請求項 17 または 18 に記載の核酸の検出方法において、
上記工程 (c) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方の H^+
濃度の変化を、電氣的に測定することを特徴とする核酸の検出方法。

【請求項 23】 プライマー伸長反応を行なうための反応槽と、ピロリン酸
を測定するためのピロリン酸測定槽と、上記反応槽と上記ピロリン酸測定槽とを
接続する流路とを備え、

上記流路は、開閉可能に構成されていることを特徴とする試料溶液導入チップ
。

【請求項 24】 請求項 23 に記載の試料溶液導入チップにおいて、
上記ピロリン酸測定槽は、上記ピロリン酸測定槽内に設けられた内部槽と、上
記ピロリン酸測定槽内を溶液を貯留するための上記内部槽の内部領域と外部領域
とに区画する、 H^+ を通しにくい膜と、上記内部槽に外部領域に貯留される溶液
に接触するように設けられた電極と、上記内部槽の内部領域に貯留される溶液に
接触するように設けられた H^+ 感受性電極とを備え、

上記膜には、 H^+ -ピロホスファターゼが、そのピロリン酸を加水分解する活
性部位を上記外部領域に露出するように保持されていることを特徴とする試料溶
液導入チップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】**【発明の属する技術分野】**

本発明は、ピロリン酸の測定方法、ピロリン酸の測定装置、核酸の検出方法および核酸の検出装置に関する。

【0002】**【従来の技術】****—第1の従来技術—**

特定の塩基配列を有する核酸の有無を調べる技術は非常に重要な技術である。例えば、遺伝病の診断、細菌およびウイルス等による食品の汚染検査、細菌およびウイルス等の人体への感染検査などにおいて必須の技術である。

【0003】

重症複合型免疫不全症、家族性高コレステロール血症等の遺伝病は、特定の遺伝子の欠損が原因で起こることが明らかになっている。このため、上記遺伝病の原因となる特定の塩基配列を有する遺伝子の有無を調べることによって、遺伝病の有無を診断できる。

【0004】

近年、大腸菌O157等による食品汚染が社会的問題となっている。このような細菌およびウイルス等による食品の汚染検査は、汚染が疑われる細菌あるいはウイルスに特有のDNAまたはRNAの塩基配列の有無を解析することによって、汚染の有無を判断することができる。人体への感染検査に関しても同様である。

【0005】

通常、上述のような特定の核酸の塩基配列の検出技術では、試料である特定の塩基配列を含む核酸が微量である場合が多いので、検出感度が非常に高いことが求められる。現在、最も一般的に用いられている検出技術は、標的塩基配列を有する核酸の増幅法を利用する技術である。例えば、PCR法、ICAN法、LCR法、SDA法、LAMP法等が挙げられる。これらの核酸の増幅法によって、試料中の標的塩基配列を有する核酸を大量に増幅し、標的塩基配列を有する核酸を検出する。上記の増幅法は、容易に標的塩基配列を有する核酸を増幅できる。

しかし、増幅された標的塩基配列を有する核酸を検出する方法には幾つか不具合がある。

【 0 0 0 6 】

増幅された標的塩基配列を有する核酸を検出するための最も汎用的な方法の 1 つは、増幅された標的塩基配列を有する核酸を電気泳動によって分離した後、臭化エチジウム等の蛍光インターカレート剤を用いる方法である。この方法は簡便である一方で、蛍光インターカレート剤が発ガン物質であるため、取り扱いには非常に注意を要する。

【 0 0 0 7 】

また他の方法としてはドットプロット法が挙げられる。ドットプロット法は、まず増幅された標的塩基配列を有する二本鎖の DNA または RNA を、熱処理によって一本鎖の DNA または RNA に変性させ、ナイロン等のメンブレンに固定する。続いて、放射性標識あるいは蛍光標識がなされ、かつ上記一本鎖の DNA または RNA に特異的に反応する核酸プローブをメンブレン上でハイブリダイズさせる。最後に、放射性標識あるいは蛍光標識の検出を行なうことによって増幅された標的塩基配列を有する二本鎖の DNA または RNA の検出を行なう。しかしこの方法では、放射性標識された核酸プローブを用いる場合、通常 1 ～ 5 日程度の日数がかかる。また、蛍光標識された核酸プローブを用いる場合でも数時間～十数時間を要する。さらに、増幅された標的塩基配列を有する核酸のそれぞれに対して、標識された核酸プローブを調製する必要があるため、非常に煩雑である。

【 0 0 0 8 】

PCR 法は、通常 DNA ポリメラーゼを用いてプライマーからの DNA 伸長反応（以下、プライマー伸長反応と称する）を繰り返しながら標的塩基配列を有する核酸を増幅する技術である。プライマー伸長反応を用いた応用は、標的塩基配列を有する核酸の検出に限られない。

【 0 0 0 9 】

近年では、いわゆる SNP（Single Nucleotide Polymorphism：一塩基多型）と呼ばれる塩基配列中のわずか 1 塩基対の多型

が糖尿病や高血圧等の疾患に対するなりやすさや、あるいは薬の効きやすさ等に影響を与えていることが明らかになってきている。従って、各個人のSNPパターンを解析する、いわゆるSNPタイピング技術が非常に重要視されている。また、ゲノムDNAにおける塩基配列中のたった1塩基対の置換が重篤な疾病の原因となる例が知られている。従って、このような1塩基対の置換の有無を解析することもまた非常に重要になってきている。SNPタイピング技術は、このような1塩基対の置換の有無の判別においても有効な技術である。

【0010】

現在、様々なSNPタイピング技術が開発あるいは既に実施されている。それらの技術のうち、最も簡便な技術の1つでは、プライマー伸長反応を利用する。この技術では、プライマー伸長反応が起こるか否かを判定することによって、SNPタイピングを行なう。

【0011】

現在、プライマー伸長反応を利用したSNP部位の塩基種の判別技術は、大きく二種類に分けられる。一方は、4種類のdNTP（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）を用いるプライマー伸長反応を利用する方法であり、もう一方は、一種類のdNTPあるいはddNTPのみを用いるプライマー伸長反応を利用する方法である。

【0012】

4種類のdNTPを用いてプライマー伸長反応を利用する方法を図19および図20を参照しながら説明する。この方法では、標的DNAのSNP部位に隣接する塩基配列に対して相補的な塩基配列を有し、標的DNAのSNP部位の塩基種に応じて伸長反応の進行に差を生じさせるプライマー（以下、タイピングプライマーと称する）を用いる。具体的には、以下に説明する工程を実施する。

【0013】

まず、図19（a）に示す工程で、SNP部位S1を有する標的のDNA1を含む試料溶液を調製する。同様に、図20（a）に示す工程で、SNP部位S2を有する標的のDNA2を含む試料溶液を調製する。

【0014】

次に、図19（b）に示す工程で、DNA 1を熱変性などによって一本鎖DNA 3および4とする。同様に、図20（b）に示す工程で、DNA 2を熱変性などによって一本鎖DNA 5および6とする。

【0015】

次に、図19（c）に示す工程で、一本鎖DNA 3および4を含む試料溶液に、タイピングプライマー7、DNAポリメラーゼ8および4種類のdNTPを添加する。同様に、図20（c）に示す工程で、一本鎖DNA 5および6を含む試料溶液に、タイピングプライマー7、DNAポリメラーゼ8および4種類のdNTPを添加する。ここで、タイピングプライマー7は、その3'末端の塩基（ここでは、チミン（以下Tと記す））以外は、一本鎖DNA 4および6のSNP部位よりも3'末端側の領域と完全にハイブリダイズするように設計されている。

【0016】

次に、図19（d）に示す工程で、SNP部位S1がアデニン（以下Aと記す）である一本鎖DNA 4にタイピングプライマー7は完全にハイブリダイズする。このため、プライマー伸長反応が起こり、DNAポリメラーゼ8によってdNTPが消費される。

【0017】

一方、図20（d）に示す工程で、SNP部位S2がグアニン（以下Gと記す）である一本鎖DNA 6にタイピングプライマー7の3'末端の塩基（T）のみハイブリダイズできない状態になる。このため、正常なプライマー伸長反応が起こりにくい。従って、dNTPはほとんど消費されない。

【0018】

従って、これらの伸張反応の進行の差を解析することによってSNP部位の塩基の判別ができる。このように、プライマー伸長反応が起こるか否かによってSNP部位の塩基の判別を行なう。この方法では、SNP部位の塩基が3種類あるいは4種類の可能性がある場合にも、それぞれに対応したタイピングプライマーを用意すれば同様に解析できる。

【0019】

タイピングプライマーに関しては、上述のような3'末端塩基を、DNAのS

N P 部位の塩基と対応させたプライマー以外のものも開発されている。例えば、東洋紡績（株）によって開発された A S P (A l l e l e S p e c i f i c P r i m e r が挙げられる（非特許文献 1 を参照）。A S P は、その 3' 末端から 2 番目の塩基が S N P 部位に対応しており、さらにその 3' 末端から 3 番目の塩基が標的の塩基に対して必ず非相補的であるように設計されているプライマーである。

【0020】

【非特許文献 1】

東洋紡績（株）ウェブサイト、平成14年10月1日検索、URL (<http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/product/custom/snps/snps.html>)。

【0021】

A S P を、校正活性の強い α 型 D N A ポリメラーゼとともに用いることによって、上述の図 19 および図 20 に示した方法よりも正確な S N P 部位の塩基種の判別が可能となると報告されている。すなわち、S N P 部位が A S P の 3' 末端から 2 番目の塩基と相補的である場合には良好に伸長反応が起き、相補的でない場合は正常に伸長反応が起きない。また、伸長反応が起きた場合と起きない場合における伸長反応の進行の差が、上記図 19 および図 20 に示した方法に比べて大きいと報告されている。

【0022】

次に、1 種類の d N T P （または d d N T P）を用いてプライマー伸長反応を利用する方法を図 21 および図 22 を参照しながら説明する。この方法では、標的の一本鎖 D N A において S N P 部位に隣接した領域とハイブリダイズするように設計されたプライマーを用いて伸長反応を行なう。すなわちプライマー配列中に S N P 部位に対応する部位は存在しない。具体的には、以下に説明する工程を実施する。

【0023】

まず、図 21 (a) に示す工程で、S N P 部位 S 1 を有する標的の D N A 1 を含む試料溶液を調製する。同様に、図 22 (a) に示す工程で、S N P 部位 S 2 を有する標的の D N A 2 を含む試料溶液を調製する。

【0024】

次に、図21(b)に示す工程で、DNA1を熱変性などによって一本鎖DNA3および4にする。同様に、図22(b)に示す工程で、DNA2を熱変性などによって一本鎖DNA5および6にする。

【0025】

次に、図21(c)に示す工程で、一本鎖DNA3および4を含む試料溶液に、プライマー9、DNAポリメラーゼ8およびdCTP（またはddCTP）を添加する。同様に、図22(c)に示す工程で、一本鎖DNA5および6を含む試料溶液に、プライマー9、DNAポリメラーゼ8およびdCTP（またはddCTP）を添加する。ここで、プライマー9は、一本鎖DNA4および6のSNP部位よりも3'末端側に隣接する領域と完全にハイブリダイズするように設計されている。

【0026】

次に、図21(d)に示す工程で、一本鎖DNA4にプライマー9は完全にハイブリダイズする。しかし、SNP部位S1がAであり、dCTP（またはddCTP）しか供給されていないので、プライマー伸長反応は起こらない。このため、DNAポリメラーゼ8によってdCTP（またはddCTP）がほとんど消費されない。

【0027】

一方、図22(d)に示す工程で、一本鎖DNA6にプライマー9は完全にハイブリダイズする。このとき、SNP部位S2がGであるため、dCTP（またはddCTP）の供給によって正常なプライマー伸長反応が起こる。従って、DNAポリメラーゼ8によってdCTP（またはddCTP）が消費される。

【0028】

なお、SNP部位の塩基が三種類あるいは四種類の可能性がある場合は、それぞれに対応したdNTPあるいはddNTPを用いることによって同様に解析できる。

【0029】

このように、1種類のdNTPあるいはddNTPのみを用いる方法では、上

記の 4 種類全ての d N T P を用いる方法とは異なり、d N T P を用いる場合は通常 1 ～数塩基程度、d d N T P を用いる場合は 1 塩基しかプライマーに付加されない。従って、伸長反応の進行の差を検出することが非常に困難である。そこで、以下に示す特許文献 1 および 2 では、伸長反応の進行の差を検出するために、プライマー伸長反応の進行に伴って生成されるピロリン酸を A T P に変換し、その後ルシフェラーゼ反応を利用してピロリン酸の量を測定する方法を用いている。1 種類の d N T P のみを用いる方法の利点としては、プライマーの設計の仕方によって、図 2 1 あるいは図 2 2 に示す各工程に準ずる工程を繰り返すことによって、S N P 部位だけでなく、S N P 部位近辺の塩基配列を判別することも可能であるという点が挙げられる。

【 0 0 3 0 】

【特許文献 1】

特表 2 0 0 1 - 5 0 6 8 6 4 号公報（要約の欄）

【特許文献 2】

特表 2 0 0 1 - 5 0 1 0 9 2 号公報（要約の欄）。

【 0 0 3 1 】

以上のようにプライマー伸長反応を利用した S N P 部位の塩基種の判別技術は幾つかの種類があるが、いずれの S N P 部位の塩基種の判別技術においても、プライマー伸長反応の進行の差を解析して S N P 部位の塩基種の判別を行なうという点は共通している。

【 0 0 3 2 】

このような S N P 部位の塩基種の判別技術は、いわゆる S N P 部位のみならず所望の特定塩基の判別にも応用が可能である非常に有用な技術である。近い将来、大小様々な規模の病院で日常的に利用される可能性が高い。従って、より安全かつ正確にプライマー伸長反応の差を解析できる方法が必要とされている。

【 0 0 3 3 】

—第 2 の従来技術—

ピロリン酸は、細胞内における酵素反応に深く関与していることが知られている。例えば、蛋白質の合成過程において、アミノ酸がアミノアシルアデニル酸を

經由してアミノアシル tRNA を形成する反応においてピロリン酸が生成される。また、例えば、植物などに見られるデンプン合成の過程では、グルコース-1-リン酸と ATP との反応によって ADP-グルコースが生成される際に、ピロリン酸が生成される。これら以外にも、種々の酵素反応においてピロリン酸が関与していることが知られている。従って、ピロリン酸を定量的に検出する技術は、細胞状態、あるいは上記の酵素反応等を解析する上で重要な技術である。

【0034】

従来のピロリン酸測定方法として、Grindley らの化学的方法（非特許文献 2 を参照）が知られている。しかし、この方法では濃硫酸を用いるので、非常に危険が伴う。

【0035】

【非特許文献 2】

G. B. Grindley and C. A. Nichel, Anal. Biochem., vol 33, p 114 (1970)

【特許文献 3】

特開昭 61-12300 号公報。

【0036】

上記特許文献 3 では、濃硫酸などの危険な薬品を用いずに、酵素を利用した三種類のピロリン酸測定方法が開示されている。それらに関して以下に説明する。

【0037】

第 1 の方法は、ピロリン酸をホスホエノールピルビン酸およびアデノシン-リン酸の存在下で、ピルベートオルソホスフェートジキナーゼを作用させる方法である。この反応によってピルビン酸が生成されるので、ピルビン酸の量を測定することによってピロリン酸の量を算出することができる。なお、ピルビン酸の量を測定する方法は二種類の方法が提案されている。1 つは、ラクテートデヒドロゲナーゼの触媒作用を利用してピルビン酸を NADH で還元する際に、NADH の減少を比色定量する方法である。もう 1 つは、生成したピルビン酸にピルベートオキシダーゼを作用させて生成する過酸化水素を色素に導くことによって比色定量する方法である。

【0038】

第2の方法は、ピロリン酸をシチジン二リングリセロールの存在下でグリセロール-3-ホスフェートシチジルトランスフェラーゼに作用させる方法である。この反応によってグリセロール三リン酸が生成される。従って、グリセロール三リン酸の生成量を測定することでピロリン酸の量を算出することができる。グリセロール三リン酸の量を測定する方法は二種類の方法が提案されている。1つは、グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼの触媒作用を利用してグリセロール三リン酸をNAD(P)で酸化する際に、NAD(P)Hの増加を比色定量する方法である。もう1つは、生成したグリセロール三リン酸にグリセロール-3-ホスフェートオキシダーゼを作用させて生成する過酸化水素を色素に導きこれを比色定量する方法である。

【0039】

第3の方法は、ピロリン酸をシチジン二リン酸リビトールの存在下でリビトール-5-ホスフェートシチジルトランスフェラーゼを作用させる方法である。この反応によってD-リビトール-5-リン酸が生成されるため、その生成量を測定することでピロリン酸量を測定することができる。D-リビトール-5-リン酸を測定する方法は、NAD(またはNADP)の存在下でリビトール-5-ホスフェートデヒドロゲナーゼを作用させてNADH(またはNADPH)の増加を比色定量する方法が提案されている。

【0040】**【発明が解決しようとする課題】**

上記第1の従来技術で述べたように、プライマー伸長反応を利用したSNP部位の塩基種の判別技術は幾つかの種類があり、いずれのSNP部位の塩基種の判別技術においても、プライマー伸長反応の進行の差を解析してSNP部位の塩基種の判別を行なうという点で共通している。

【0041】

プライマー伸長反応の差を解析する方法は2種類ある。1つは、PCR法、ICAN法、LCR法、SDA法、LAMP法等の標的塩基配列を有する核酸の増幅法を利用する技術である。つまり、プライマーの1つとして上記のタイピング

プライマーを用いてSNP部位を含む塩基配列の増幅を行なう。その結果、タイピングプライマーの3'末端塩基が解析対象SNP部位と相補的である場合、標的塩基配列を有する核酸が良好に増幅されるが、相補的でない場合、核酸が増幅されにくい。従って、蛍光インターカレート剤等の検出方法で目的の塩基配列断片の量を測定することでSNP部位の塩基種の判別ができる。しかし既に述べたように、蛍光インターカレート剤が発ガン物質であるため非常に危険な操作が必要となる不具合がある。

【0042】

もう1つは、プライマー伸長反応に伴って生成されるピロリン酸の量を測定する方法である。例えば、ピロリン酸をATPに変換し、その後ルシフェラーゼ反応を利用する方法が知られている。しかし、プライマー伸長反応においてdATPを用いる場合、dATPはATPと同様にルシフェラーゼ反応の基質になる。このため、正確なSNP部位の塩基種の判別ができない。従って、dATPの代わりにDNAポリメラーゼの基質として作用し、且つルシフェラーゼ反応の基質としては作用しない特殊なdATPアナログを用いる必要があるという不具合がある。

【0043】

また、上記第2の従来技術で述べたように、他のピロリン酸の測定技術においても、複数種の酵素、試薬などを必要とし、コストが増大し、工程が複雑化してしまうという不具合がある。

【0044】

本発明は上記不具合を解決するためになされたものであり、ピロリン酸を測定する簡便な技術、ならびに標的核酸の検出および標的核酸の塩基配列中の塩基種の判定技術を提供する。

【0045】

【課題を解決するための手段】

本発明のピロリン酸の測定方法は、 H^+ -ピロホスファターゼを保持し且つ H^+ を通しにくい膜によって区画された第1領域および第2領域のうち、上記第1領域にピロリン酸を含む第1溶液を、上記 H^+ -ピロホスファターゼに上記第1溶

液が接触するように貯留させるとともに、上記第2領域に第2溶液を貯留させる工程(a)と、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を測定する工程(b)とを含み、上記 H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第1領域に露出している。

【0046】

自然界では、 H^+ -ピロホスファターゼは、そのピロリン酸を加水分解する活性部位が液胞膜の外側に露出するように液胞膜に保持されており、1分子のピロリン酸から2分子のリン酸を生成する加水分解反応に伴って、液胞膜の外側から液胞膜の内側に向けて H^+ を輸送する性質を有する。このため、 H^+ -ピロホスファターゼの酵素反応によって、液胞膜の内部では H^+ 濃度が増大し、液胞膜の外部では H^+ 濃度が減少する。本発明によれば、 H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位が露出している第1領域にピロリン酸を含む第1溶液を、 H^+ -ピロホスファターゼに第1溶液が接触するように貯留させることによって、第1領域から第2領域へ H^+ が輸送され、第1溶液および第2溶液の H^+ 濃度が変化する。このため、第1溶液および第2溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を測定することによって、第1溶液中のピロリン酸の量を測定することができる。従って、本発明のピロリン酸の測定方法では、ピロリン酸の測定に複数種の酵素、試薬などが不要であり、工程も単純で、ピロリン酸の測定にかかるコストが低減される。

【0047】

上記膜は、もう1つの H^+ -ピロホスファターゼを保持しており、上記もう1つの H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第2領域に露出しており、上記第2溶液のピロリン酸の濃度は、上記第1溶液のピロリン酸の濃度よりも低い構成としてもよい。

【0048】

上記工程(b)では、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を、光学的に測定する構成としてもよい。

【0049】

上記工程(a)では、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方に、p

H感受性色素または膜電位感受性色素が添加されていてもよい。

【0050】

上記工程（a）では、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方に、アクリジンオレンジまたはオクソノールVが添加されていることが好ましい。

【0051】

アクリジンオレンジは、pHの変化に非常に鋭敏なpH感受性色素であり、オクソノールVは、膜電位の変化に非常に鋭敏な膜電位感受性色素であるので、いずれの色素を添加した場合も、ピロリン酸の量を非常に高い精度で測定できる。

【0052】

上記工程（b）では、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方のH⁺濃度の変化を、電氣的に測定する構成としてもよい。

【0053】

本発明のピロリン酸測定装置は、容器と、上記容器内に設けられた内部槽と、上記容器内を、溶液を貯留するための上記内部槽の内部領域と外部領域とに区画する、H⁺を通しにくい膜と、上記内部槽の上記外部領域に貯留される溶液に接触するように設けられた電極と、上記内部槽の上記内部領域に貯留される溶液に接触するように設けられたH⁺感受性電極とを備え、上記膜には、H⁺-ピロホスファターゼが、そのピロリン酸を加水分解する活性部位を上記外部領域に露出するように保持されている。

【0054】

容器内に試料溶液が注入されると、試料溶液中にピロリン酸が存在する場合、H⁺-ピロホスファターゼの酵素反応が生じて、膜によって隔てられた内部槽の内部領域ではH⁺濃度が増大し、内部槽の外部領域ではH⁺濃度が減少する。このため、電極とH⁺感受性電極とによって、電氣的にH⁺濃度の変化を測定することによって、ピロリン酸の量を測定することができる。

【0055】

本発明の核酸の塩基配列中の塩基種の判別方法は、核酸と、上記核酸に相補的に結合する相補結合領域を含む塩基配列を有するプライマーとを含む溶液を調製し、上記プライマーの伸長反応を行なうことによって反応溶液を調製する工程（

a) と、 H^+ -ピロホスファターゼを保持し且つ H^+ を通しにくい膜によって区画された第1領域および第2領域のうち、上記工程(a)においてプライマーの伸長反応が生じた場合に生成するピロリン酸を含む上記反応溶液から調製された第1溶液を、上記 H^+ -ピロホスファターゼに上記第1溶液が接触するように貯留させるとともに、上記第2領域に第2溶液を貯留させる工程(b)と、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を測定する工程(c)とを含み、上記 H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第1領域に露出している。

【0056】

特定の塩基の塩基種を判別する方法として、例えば、判別したい塩基の3'側に隣接する塩基配列に対して完全に相補的な配列を有するプライマーと、判別したい塩基の予想される塩基種に対して相補的であるdNTPとを用いてプライマー伸長反応を行なった場合に、プライマー伸長反応の進行の程度によって、判別したい塩基の塩基種を判別する方法がある。また、判別したい塩基を含む塩基配列に対して相補的な塩基配列を有し、且つ4種類のdNTPを同時に用いてプライマー伸長反応を行なった場合に、判別したい塩基の塩基種に依存してプライマー伸長反応の進行の程度に差が生じるプライマーを用いる方法もある。いずれの方法も、プライマー伸長反応の進行の程度によって、特定の塩基の塩基種を判別する点が共通している。プライマー伸長反応が起こると、ピロリン酸が生成する。本発明では、プライマー伸長反応によって生成するピロリン酸を測定することによって、プライマー伸張反応の進行の程度を解析することができる。従って、特定の塩基の塩基種を判別することが可能である。

【0057】

上記膜は、もう1つの H^+ -ピロホスファターゼを保持しており、上記もう1つの H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第2領域に露出しており、上記第2溶液のピロリン酸の濃度は、上記第1溶液のピロリン酸の濃度よりも低い構成としてもよい。

【0058】

上記工程(c)では、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方の H^+

濃度の変化を、光学的に測定する構成としてもよい。

【0059】

上記工程 (b) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方には pH 感受性色素または膜電位感受性色素が添加されていてもよい。

【0060】

上記工程 (b) では、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方にはアクリジンオレンジまたはオクソノール V が添加されていることが好ましい。

【0061】

上記工程 (c) における上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を、電気的に測定する構成としてもよい。

【0062】

本発明の塩基種判別装置は、プライマー伸長反応に必要な温度調節を行なう反応部と、ピロリン酸を測定するピロリン酸測定部とを備え、上記ピロリン酸測定部は、プライマー伸長反応により生じるピロリン酸を含む第 1 溶液を、 H^+ -ピロホスファターゼを保持し且つ H^+ を通しにくい膜によって区画された第 1 領域および第 2 領域のうち、上記第 1 領域に上記 H^+ -ピロホスファターゼに上記第 1 溶液が接触するように貯留させ、上記第 2 領域に第 2 溶液を貯留させた後、上記第 1 溶液および上記第 2 溶液のいずれか一方の H^+ 濃度の変化を測定する構成となっている。

【0063】

特定の塩基の塩基種を判別する方法として、例えば、判別したい塩基の 3' 側に隣接する塩基配列に対して完全に相補的な配列を有するプライマーと、判別したい塩基の予想される塩基種に対して相補的である dNTP とを用いてプライマー伸長反応を行なった場合に、プライマー伸長反応の進行の程度によって、判別したい塩基の塩基種を判別する方法がある。また、判別したい塩基を含む塩基配列に対して相補的な塩基配列を有し、且つ 4 種類の dNTP を同時に用いてプライマー伸長反応を行なった場合に、判別したい塩基の塩基種に依存してプライマー伸長反応の進行の程度に差が生じるプライマーを用いる方法もある。いずれの方法も、プライマー伸長反応の進行の程度によって、特定の塩基の塩基種を判別

する点が共通している。プライマー伸長反応が起こると、ピロリン酸が生成する。本発明の塩基種判別装置によれば、プライマー伸長反応によって生成するピロリン酸を測定することによって、プライマー伸張反応の進行の程度を解析することができる。従って、特定の塩基の塩基種を判別することが可能である。

【0064】

また、試料溶液中に特定の塩基配列を有する核酸の有無を判別したい場合、プライマー伸張反応が進行していれば、溶液中に、プライマーに相補的な塩基配列を有する核酸が存在していることがわかる。逆に、プライマー伸張反応があまり進行していなければ、溶液中に、プライマーに相補的な塩基配列を有する核酸が存在していないことがわかる。このように、本発明の塩基種判別装置を用いて、試料溶液中の特定の塩基配列を有する核酸の有無を判別、すなわち、特定の核酸を検出することも可能である。

【0065】

上記反応部は、試料溶液を導入するための試料溶液導入チップを挿入可能なスロットを有する構成としてもよい。

【0066】

上記反応部と上記ピロリン酸測定部とを制御し、測定結果を解析する解析手段をさらに備える構成としてもよい。

【0067】

本発明の核酸の検出方法は、特定の塩基配列を有する核酸に相補的に結合するプライマーを含む溶液を調製し、上記プライマーの伸長反応を行なうことによって反応溶液を調製する工程（a）と、 H^{+} -ピロホスファターゼを保持し且つ H^{+} を通しにくい膜によって区画された第1領域および第2領域のうち、上記工程（a）においてプライマーの伸長反応が生じた場合に生成するピロリン酸を含む上記反応溶液から調製された第1溶液を、上記 H^{+} -ピロホスファターゼに上記第1溶液が接触するように貯留させるとともに、上記第2領域に第2溶液を貯留させる工程（b）と、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方の H^{+} 濃度の変化を測定する工程（c）とを含み、上記 H^{+} -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第1領域に露出している。

【0068】

プライマーは、相補的な塩基配列を有する核酸にハイブリダイズし、プライマー伸長反応によって伸長する。プライマー伸長反応が起こると、ピロリン酸が生成する。本発明によれば、プライマー伸張反応の進行の程度を、ピロリン酸の量を測定することによって解析することができる。プライマー伸張反応が進行していれば、第1溶液中に、プライマーに相補的な塩基配列を有する核酸が存在していることがわかる。逆に、プライマー伸張反応があまり進行していなければ、第1溶液中に、プライマーに相補的な塩基配列を有する核酸がほとんど存在していないことがわかる。このようにして、第1溶液中の特定の塩基配列を有する核酸の有無を判別、すなわち、特定の核酸を検出することができる。

【0069】

上記膜は、もう1つのH⁺-ピロホスファターゼを保持しており、上記もう1つのH⁺-ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、上記第2領域に露出しており、上記第2溶液のピロリン酸の濃度は、上記第1溶液のピロリン酸の濃度よりも低い構成としてもよい。

【0070】

上記工程(c)では、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方のH⁺濃度の変化を、光学的に測定する構成としてもよい。

【0071】

上記工程(b)において、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方にはpH感受性色素または膜電位感受性色素が添加されていてもよい。

【0072】

上記工程(b)において、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方にはアクリジンオレンジまたはオクソノールVが添加されていることが好ましい。

【0073】

上記工程(c)では、上記第1溶液および上記第2溶液のいずれか一方のH⁺濃度の変化を、電気的に測定する構成としてもよい。

【0074】

本発明の試料溶液導入チップは、プライマー伸長反応を行なうための反応槽と

、ピロリン酸を測定するためのピロリン酸測定槽と、上記反応槽と上記ピロリン酸測定槽とを接続する流路とを備え、上記流路は、開閉可能に構成されている。

【0075】

本発明の試料溶液導入チップによれば、流路が開閉可能であるので、反応槽とピロリン酸測定槽とをそれぞれ密閉することが可能である。従って、互いに反応温度条件が異なるプライマー伸長反応とピロリン酸の測定とを1つのチップ上で行なうことができる。

【0076】

上記ピロリン酸測定槽は、上記ピロリン酸測定槽内に設けられた内部槽と、上記ピロリン酸測定槽内を溶液を貯留するための上記内部槽の内部領域と外部領域とに区画する、 H^+ を通しにくい膜と、上記内部槽に外部領域に貯留される溶液に接触するように設けられた電極と、上記内部槽の内部領域に貯留される溶液に接触するように設けられた H^+ 感受性電極とを備え、上記膜には、 H^+ -ピロホスファターゼが、そのピロリン酸を加水分解する活性部位を上記外部領域に露出するように保持されていることが好ましい。

【0077】

ピロリン酸測定槽内に試料溶液が注入されると、試料溶液中にピロリン酸が存在する場合、 H^+ -ピロホスファターゼの酵素反応が生じて、膜によって隔てられた内部槽の内部領域では H^+ 濃度が増大し、内部槽の外部領域では H^+ 濃度が減少する。このため、電極と H^+ 感受性電極とによって、電氣的に H^+ 濃度の変化を測定することによって、ピロリン酸の量を測定することができる。

【0078】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照しながら本発明の実施形態を説明する。なお、本明細書中に記載されているDNA、RNAなどの核酸は、特に指示のない限り二本鎖である。

【0079】

(実施形態1)

本実施形態では、試料中の標的DNAのSNP部位の塩基配列を判別する方法

を説明する。具体的には、4種類のdNTPを用いてプライマー伸長反応（例えば、PCR法、ICAN法、LCR法、SDA法、LAMP法等の増幅反応）を利用する方法を図1および図2を参照しながら説明する。図1および図2は、本実施形態の試料中の標的DNAのSNP部位の塩基種を判別する方法を表す工程図である。

【0080】

本実施形態の方法では、標的DNAのSNP部位に隣接する塩基配列に対して相補的な塩基配列を有し、標的DNAのSNP部位の塩基種に応じて伸長反応の進行に差を生じさせるプライマー（以下、タイピングプライマーと称する）を用いる。なお、本実施形態では、タイピングプライマーが作用する方の一本鎖状態の標的DNAにおけるSNP部位の塩基がAかGの可能性があり、Gの場合だとプライマー伸長反応は行われませんが、Aの場合だと行われるように設計されたタイピングプライマーを用いる例を示す。

【0081】

まず、図1（a）に示す工程で、SNP部位S1を有する標的のDNA1、タイピングプライマー7、DNAポリメラーゼ8および4種類のdNTPを含む試料溶液を調製する。同様に、図2（a）に示す工程で、SNP部位S2を有する標的のDNA2、タイピングプライマー7、DNAポリメラーゼ8および4種類のdNTPを含む試料溶液を調製する。ここで、タイピングプライマー7は、その3'末端の塩基（ここでは、チミン（以下Tと記す））以外は、一本鎖DNA4および6のSNP部位よりも3'末端側の領域と完全にハイブリダイズするように設計されている。また、本実施形態で用いるDNAポリメラーゼ8は、一般にPCR等に用いられる耐熱性を有する公知の酵素である。

【0082】

次に、図1（b）に示す工程で、試料溶液を加温し、DNA1を熱変性させることによって一本鎖DNA3および4とする。同様に、図2（b）に示す工程で、試料溶液を加温し、DNA2を熱変性させることによって一本鎖DNA5および6とする。

【0083】

次に、図1(c)に示す工程で、試料溶液を冷却し、一本鎖DNA 3および4に、タイピングプライマー7をハイブリダイズさせる。同様に、図2(c)に示す工程で、試料溶液を冷却し、一本鎖DNA 5および6に、タイピングプライマー7をハイブリダイズさせる。

【0084】

次に、図1(d)に示す工程で、試料溶液の温度をプライマー伸長反応に最適な温度に調節する。SNP部位S1がアデニン（以下Aと記す）である一本鎖DNA 4にタイピングプライマー7は完全にハイブリダイズする。このため、プライマー伸長反応が起こり、DNAポリメラーゼ8によってdNTPが消費され、ピロリン酸が生成する。

【0085】

一方、図2(d)に示す工程でも、試料溶液の温度をプライマー伸長反応に最適な温度に調節する。しかしながら、SNP部位S2がグアニン（以下Gと記す）である一本鎖DNA 6には、タイピングプライマー7の3'末端の塩基（T）のみハイブリダイズできない状態になる。このため、正常なプライマー伸長反応が起こりにくい。従って、dNTPはほとんど消費されず、ピロリン酸はほとんど生成されない。

【0086】

続いて、以上に述べた図1(b)から(d)に示す工程、および図2(b)から(d)に示す工程を繰り返すことによって、プライマー伸張反応を繰り返す。このことによって、図1(d)および図2(d)に示すプライマー伸張反応の進行の差が顕著に現れる。

【0087】

なお、本実施形態の方法に代えて、タイピングプライマー7をPCR反応時に使用する2本のプライマーのうちの1本として用い、もう1本のプライマーと共に用いることによってPCR反応を行なってもよい。このことによって、プライマー伸長反応の進行の差は指数関数的に広がっていく。また、PCR法以外の増幅反応を適用することも可能である。

【0088】

最後に、図 1 (d) および図 2 (d) に示すプライマー伸張反応の進行の差を、ピロリン酸の量を測定することによって解析する。このことによって、SNP 部位の塩基種の判別ができる。次に、本実施形態のピロリン酸の量の測定方法を図 3 を参照しながら説明する。

【0089】

本実施形態では、ピロリン酸の量を測定するために、 H^+ -ピロホスファターゼを用いる。図 3 は、 H^+ -ピロホスファターゼを模式的に表す図である。

【0090】

図 3 に示すように、 H^+ -ピロホスファターゼ 11 は通常、植物等の液胞膜 13 内に存在する膜タンパク質であり、1 分子のピロリン酸 10 から 2 分子のリン酸 12 を生成する加水分解反応に伴って、 H^+ を通さない、あるいは通しにくい液胞膜 13 の外側から液胞膜 13 の内側に向けて H^+ を輸送する性質を有する。このため、 H^+ -ピロホスファターゼの酵素反応によって、液胞膜の内部では H^+ 濃度が増大し、液胞膜の外部では H^+ 濃度が減少する。

【0091】

そこで、本実施形態では、ピロリン酸を含む試料溶液を、植物細胞等から単離してきた液胞膜に内在している状態の H^+ -ピロホスファターゼに接触させる。この後、液胞膜の内側あるいは液胞膜の外側の H^+ 濃度の変化を測定する。このことによって、試料溶液中のピロリン酸の量を測定し、図 1 (d) および図 2 (d) に示すプライマー伸張反応の進行の差を解析することができる。プライマー伸張反応の進行の差を解析することによって、試料中に含まれる SNP 部位の塩基種を判別できる。

【0092】

H^+ 濃度の変化を測定する方法としては、 H^+ 濃度の変化を光学的変化に変換して測定する方法と、電氣的に測定する方法が挙げられる。 H^+ 濃度の変化を光学的変化に変換して測定する方法としては、pH 試験紙や pH 感受性色素、膜電位感受性色素等を用いる方法が挙げられる。電氣的に測定する方法としては、金属電極法（水素電極法、キンヒドロロン電極法、アンチモン電極法等）、ガラス電極法、ISFET 電極法、パッチクランプ法、LAPS 法（Light-Add r

essable Potentiometric Sensor) 等が挙げられる。

【0093】

上記の H^+ 濃度の変化を測定する方法と、上記の H^+ -ピロホスファターゼの反応を併用することによって、試料溶液中のピロリン酸を光学的シグナルあるいは電気的シグナルに変換して測定することができる。

【0094】

なお、 H^+ 濃度の変化を測定する方法は、上記の測定方法に限られず、 H^+ 濃度の変化を光学的変化あるいは電気的变化に変換し、その光学的変化あるいは電気的变化を検知できる方法であればよい。

【0095】

次に、本実施形態のピロリン酸の測定方法を図4および図5を参照しながら説明する。図4および図5は、ピロリン酸の測定方法を表す図である。

【0096】

図4に示すように、 H^+ -ピロホスファターゼが膜に内在し、内部にpH感受性色素または膜電位感受性色素を含む膜小胞33が懸濁された溶液を反応容器31中に注いでおき、次いで、反応容器31の中に図1(d)または図2(d)で得られる試料溶液32を添加する。このとき、 H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、膜小胞33の外部に露出している。

【0097】

試料溶液32中にピロリン酸が存在する場合、 H^+ -ピロホスファターゼの酵素反応が生じて、膜小胞33の内部では H^+ 濃度が増大し、膜小胞33の外部では H^+ 濃度が減少する。このため、膜小胞33の内部の H^+ 濃度の増大によって、pH感受性色素または膜電位感受性色素の蛍光強度が変化する。この蛍光強度の変化を光学的に測定することによって、ピロリン酸の量を測定することができる。

【0098】

膜小胞33としては、細胞から単離された液胞から調製されたものを用いることができる。また、膜小胞33として、 H^+ -ピロホスファターゼを単離および

精製した後、人工的に形成した脂質二重層膜やLB膜などのH⁺を通さない、あるいは通しにくい膜内に内在するように再構築することによって形成されたものを用いてもよい。

【0099】

なお、ピロリン酸を加水分解する活性部位が、内部に露出しているH⁺-ピロホスファターゼが膜小胞33に含まれていてもよい。但し、ピロリン酸を加水分解する活性部位が内部に露出しているH⁺-ピロホスファターゼが含まれている膜小胞33を用いる場合、膜小胞33の内部のピロリン酸の濃度は、膜小胞33の外部のピロリン酸の濃度よりも低くしておくことが好ましく、膜小胞33の内部にはピロリン酸を含まないことが最も好ましい。このことによって、膜小胞33の内部から外部へのH⁺の輸送が減少あるいは停止し、膜小胞33の外部から内部へのH⁺の輸送が優勢となって、膜小胞33の外部および内部のH⁺濃度の変化が、試料溶液32中に含まれるピロリン酸によるものにほぼ限定される。従って、試料溶液32中に含まれるピロリン酸の量を正確に見積もることができる。

【0100】

また、膜小胞33の膜には、H⁺-ピロホスファターゼ以外のタンパク質が含まれていてもよい。但し、これらのタンパク質は、ピロリン酸と反応しない、あるいは反応性の低いタンパク質であることが好ましい。すなわち、ピロリン酸が膜小胞33の膜中にあるH⁺-ピロホスファターゼ以外のタンパク質と反応する場合、H⁺-ピロホスファターゼと反応するピロリン酸の量が減少し、それに伴ってH⁺の輸送量が減少するからである。また、ピロリン酸とは反応せず、且つピロリン酸以外の物質との反応によってH⁺を輸送するタンパク質が膜小胞33の膜に含まれている場合、そのタンパク質が反応する物質が試料溶液32中にほとんど含まれていないことが好ましい。具体的には、膜小胞33の膜には、ピロリン酸とほとんど反応せず、且つATPとの反応によってH⁺を輸送するタンパク質であるATPaseが含まれている場合、試料溶液32中にATPをほとんど含まないようにすることが好ましい。

【0101】

なお、pH感受性色素としては、アクリジンオレンジが挙げられる。また、膜

電位感受性色素としては、オクソール V が挙げられる。いずれも、微少な pH または膜電位の変化に対して非常に鋭敏な色素である。このため、ピロリン酸の測定を高感度で行なうことが可能である。

【0102】

また、図 5 に示すピロリン酸測定装置を用いてもよい。図 5 に示すように、ピロリン酸測定装置 50 は、容器 34 と、電極 35 と、容器 34 内に設けられた内部槽 36 とを備える。内部槽 36 には、 H^+ -ピロホスファターゼが内在している膜 37 が形成されており、内部槽 36 の底部には、 H^+ 感受性電極 38 が設けられている。このとき、 H^+ -ピロホスファターゼのピロリン酸を加水分解する活性部位は、内部槽 36 の外部に露出している。

【0103】

容器 34 内に試料溶液 32 が注入されると、試料溶液 32 中にピロリン酸が存在する場合、 H^+ -ピロホスファターゼの酵素反応が生じて、膜 37 によって隔てられた内部槽 36 の内部領域 39 では H^+ 濃度が増大し、内部槽 36 の外部では H^+ 濃度が減少する。このため、電極 35 と H^+ 感受性電極 38 とを用いて、電氣的に H^+ 濃度の変化を測定することによって、ピロリン酸の量を測定することができる。本実施形態では、予め容器 34 および内部領域 39 内に、pH が測定可能である溶液（バッファーなど）を貯留した後、容器 34 内に試料溶液 32 を注入するが、これに限定されない。例えば、膜 37 を予め内部槽 36 内の H^+ 感受性電極 38 上に配置しておき、試料溶液 32 を容器 34 中に添加してもよい。このことによって、容器 34 内に試料溶液 32 を注入すると、試料溶液 32 のうちの膜 37 を透過する成分（つまりピロリン酸を含まない溶液）が内部領域 39 を満たし、電極 35 と H^+ 感受性電極 38 とを用いて、電氣的に H^+ 濃度の変化を測定することが可能になる。

【0104】

なお、ピロリン酸を加水分解する活性部位が、内部領域 39 に露出している H^+ -ピロホスファターゼが膜 37 に含まれていてもよい。但し、ピロリン酸を加水分解する活性部位が内部領域 39 に露出している H^+ -ピロホスファターゼが含まれている膜 37 を用いる場合、内部領域 39 のピロリン酸の濃度は、内部槽

36の外部のピロリン酸の濃度よりも低くしておくことが好ましく、内部領域39にはピロリン酸を含まないことが最も好ましい。このことによって、内部領域39から内部槽36の外部への H^+ の輸送が減少あるいは停止し、内部槽36の外部から内部領域39への H^+ の輸送が優勢となって、内部槽36の外部および内部領域39の H^+ 濃度の変化が、試料溶液32中に含まれるピロリン酸によるものにほぼ限定される。従って、試料溶液32中に含まれるピロリン酸の量を正確に見積もることができる。

【0105】

また、膜37には、 H^+ -ピロホスファターゼ以外のタンパク質が含まれていてもよい。但し、これらのタンパク質は、ピロリン酸と反応しない、あるいは反応性の低いタンパク質であることが好ましい。すなわち、ピロリン酸が膜37中にある H^+ -ピロホスファターゼ以外のタンパク質と反応する場合、 H^+ -ピロホスファターゼと反応するピロリン酸の量が減少し、それに伴って H^+ の輸送量が減少するからである。また、ピロリン酸とは反応せず、且つピロリン酸以外の物質との反応によって H^+ を輸送するタンパク質が膜37に含まれている場合、そのタンパク質が反応する物質が試料溶液32中にほとんど含まれていないことが好ましい。具体的には、膜37に、ピロリン酸とほとんど反応せず、且つATPとの反応によって H^+ を輸送するタンパク質であるATPaseが含まれている場合、試料溶液32中にATPをほとんど含まないようにすることが好ましい。

【0106】

また、ピロリン酸測定装置50では、電極35と H^+ 感受性電極38とによって、電氣的にピロリン酸の量を測定しているが、これに限定されない。例えば、pH感受性色素または膜電位感受性色素を含む溶液を内部槽の内部領域39に添加してもよい。このことによって、内部の H^+ 濃度の増大に伴ってpH感受性色素または膜電位感受性色素の蛍光強度が変化する。この蛍光強度の変化を光学的に測定することによって、ピロリン酸の量を測定することができる。

【0107】

以上に述べたように、ピロリン酸の量を測定するために用いる H^+ -ピロホスファターゼが内在している膜の形状は、球状であっても、平面状であっても構わ

ない。つまり、 H^+ -ピロホスファターゼが内在している膜により隔てられた2つの領域の間の H^+ の移動の全て、あるいはほとんどが、 H^+ -ピロホスファターゼによって行なわれる条件を構築すればよい。

【0108】

次に、試料中の標的DNAのSNP部位の塩基配列を判別する装置を説明する。図6は、本実施形態の塩基配列判別装置を表す模式図である。

【0109】

図6に示すように、塩基配列判別装置60は、プライマー伸長反応を行なう反応部51aおよびピロリン酸を測定するピロリン酸測定部51bを備える反応手段51と、反応部51aとピロリン酸測定部51bとを制御し、得られた結果を解析する解析手段52とを備える。また、反応手段51は、試料溶液を導入するためチップ53を挿入可能なスロットを有する。

【0110】

反応部51aは、プライマー伸長反応に必要な温度調節を行なうことが可能な構成であればよい。例えば、プライマー伸長反応としてPCR法を用いる場合、反応部51aは、試料溶液導入チップ53内の試料溶液を、核酸の変性、プライマーのアニールリング、およびポリメラーゼによるプライマー伸長反応のそれぞれに適した温度を、それぞれ設定した時間で制御できるヒーター部およびプログラム温度制御部を備える構成であることが好ましい。また、ICAN法およびLAMP法などの等温反応を用いる場合、反応部51aは、一定の温度（例えば65℃）で保持することができるヒーター部および温度制御部を備える構成であることが好ましい。なお、本実施形態では、PCR法に用いるサーマルサイクラーと同じ構成となっている。

【0111】

ピロリン酸測定部51bの構成は、 H^+ 濃度の変化を測定する手段によって異なる。上述の図4に示すように、pH感受性色素または膜電位感受性色素のような色素を用いて H^+ 濃度の変化を光学的に測定する場合、ピロリン酸測定部51bは、蛍光色素を励起するための光源部、発生した蛍光の強度を測定する蛍光強度測定部を備える構成であることが好ましい。

【0112】

また、上述の図5に示すように、電極を用いてH⁺濃度の変化を電氣的に測定する場合、ピロリン酸測定部51bは、電極35およびH⁺感受性電極38のそれぞれに電氣的に接続することが可能な接点部または端子と、電極35およびH⁺感受性電極38との間の電位差を測定することができる電位差測定部とを備える構成であることが好ましい。

【0113】

試料溶液を導入するためチップ53は、PCR槽73と、上述の図5に示すピロリン酸測定装置50と、PCR槽73とピロリン酸検出装置50とを接続する流路74cとを備える。

【0114】

PCR槽73は、精製されたDNA、タイピングプライマー、DNAポリメラーゼおよび4種類のdNTPを含む試料溶液において、PCR（プライマー伸長反応）を行なうための槽である。なお、PCR槽73には、それぞれ必要な試薬を、予め入れておいてもよいし、塩基配列判別装置60に挿入する直前に導入してもよい。

【0115】

ピロリン酸検出装置50は、上記説明の通りの構成であるので、ここでは説明を省略する。なお、ピロリン酸検出装置50の代わりに、H⁺濃度の変化を光学的変化あるいは電氣的変化に変換し、その光学的変化あるいは電氣的変化を検知できる装置を用いることが可能である。

【0116】

流路74cには、開閉部材が設けられており、開閉部材が持ち上がると、PCR槽73と、ピロリン酸検出装置50とがそれぞれ密閉される構造となっている。開閉部材は、上記塩基配列判別装置60の反応手段51により開閉できる構成となっている。

【0117】

また、解析手段52は、反応手段51に接続されており、具体的にはパーソナルコンピュータ（PC）等である。

【0118】

塩基配列判別装置 60 の動作は以下の通りである。

【0119】

まず、SNP 部位を有する標的の DNA、タイピングプライマー、DNA ポリメラーゼおよび 4 種類の dNTP を含む試料溶液を PCR 槽 73 に導入したチップ 53 を用意する。

【0120】

次に、チップ 53 を反応手段 51 のスロットに挿入する。図 6 に示すように、チップ 53 が反応手段 51 のスロットに挿入されると、PCR 槽 73 が反応部 51a 内に、ピロリン酸検出装置 50 がピロリン酸測定部 51b 内にそれぞれ位置するように、チップ 53 は反応手段 51 内に配置される。

【0121】

次に、反応手段 51 は反応部 51a において、上記図 1 (b) から (d) に示す工程、および図 2 (b) から (d) に示す工程を繰り返し行ない、チップ 53 の PCR 槽 73 に導入されている試料溶液中でプライマー伸長反応を生じさせる。なお、上記図 1 (b) から (d) に示す工程、および図 2 (b) から (d) に示す工程を繰り返す回数は、解析手段 52 に設定しておく。

【0122】

次に、上記図 1 (b) から (d) に示す工程、および図 2 (b) から (d) に示す工程が終了すると、チップ 53 の流路 74c が反応手段 51 により開放され、ピロリン酸検出装置 50 内に試料溶液が導入される。ピロリン酸測定部 51b は、プライマー伸長反応により生じたピロリン酸の量を測定する。具体的な測定方法は、上述した通りであるので、ここでは説明を省略する。

【0123】

次に、解析手段 52 は、ピロリン酸測定部 51b から得られる結果を解析し、試料中の標的 DNA の SNP 部位の塩基種を判別する。

【0124】

次に、チップ 53 の代わりに用いることができる別のチップ 53a を説明する。図 7 (a) は、本実施形態の別のチップを模式的に表す上面図であり、図 7 (

b) は、図7に示したX-X線に沿った断面図である。

【0125】

図7(a)および(b)に示すように、チップ53aは、サンプル注入口70と、DNA抽出槽71と、DNA精製槽72と、PCR槽73と、ピロリン酸検出装置50と、DNA抽出槽71とDNA精製槽72とを接続する流路74aと、DNA精製槽72とPCR槽73とを接続する流路74bと、PCR槽73とピロリン酸検出装置50とを接続する流路74cとを備える。つまり、チップ53aは、図6に示したチップ53にさらに、サンプル注入口70と、DNA抽出槽71と、DNA精製槽72と、流路74aおよび74bとが設けられた構成となっている。

【0126】

サンプル注入口70は、外部とDNA抽出槽71とを繋いでいる。サンプル注入口70からDNA抽出槽71へ、血液、唾液、毛髪および毛根などを薬液処理した試料溶液が注入される。

【0127】

DNA精製槽72は、DNAを精製し、不純物を除去するための薬液処理を行なう槽である。勿論、DNAを精製するためのカラムが設けられている構成であってもよい。

【0128】

PCR槽73は、DNA精製槽72において精製されたDNA、タイピングプライマー、DNAポリメラーゼおよび4種類のdNTPを含む試料溶液において、PCR（プライマー伸長反応）を行なうための槽である。

【0129】

なお、DNA抽出槽71、DNA精製槽72およびPCR槽73には、それぞれ必要な試薬を予め入れておいてもよいし、塩基配列判別装置60に挿入する直前に導入してもよい。

【0130】

ピロリン酸検出装置50は、上記説明の通りの構成であるので、ここでは説明を省略する。なお、ピロリン酸検出装置50の代わりに、H⁺濃度の変化を光学

的变化あるいは電気的变化に変換し、その光学的変化あるいは電気的变化を検知できる装置を用いることが可能である。

【0131】

流路 74 a、74 b および 74 c には、開閉部材 75 が設けられており、開閉部材 75 が持ち上がると、DNA 抽出槽 71 と、DNA 精製槽 72 と、PCR 槽 73 と、ピロリン酸検出装置 50 とがそれぞれ密閉される構造となっている。開閉部材 75 は、上記塩基配列判別装置 60 の反応手段 51 により開閉できる構成となっている。

【0132】

なお、開閉部材 75 の代わりに、例えば、逆流防止弁等を流路 74 a、74 b および 74 c に設けてもよい。また、ピロリン酸検出装置 50 に通じる脱気孔を設け、サンプル注入口 70 に排気ポンプを、上記脱気孔に吸気ポンプを取り付けることにより、試料溶液を、DNA 抽出槽 71、DNA 精製槽 72、PCR 槽 73、ピロリン酸検出装置 50 の各部に輸送する構成としてもよい。さらに、上記排気ポンプおよび吸気ポンプを、試料溶液と混合しない油を排出および吸引するポンプとしてもよい。いずれの構成にせよ、上記塩基配列判別装置 60 の反応手段 51 によって、DNA 抽出槽 71 と、DNA 精製槽 72 と、PCR 槽 73 と、ピロリン酸検出装置 50 とをそれぞれ密閉することが可能であればよい。このことによって、互いに酵素の反応条件（例えば、至適温度など）が異なるプライマー伸長反応とピロリン酸の測定とを 1 つのチップ上で行なうことができる。

【0133】

また、本実施形態のチップ 53 a では、DNA 抽出槽 71 と、DNA 精製槽 72 と、PCR 槽 73 とが個別の槽に分離されているが、DNA の抽出、DNA の精製および PCR を 1 つの槽で行なう構成としてもよい。

【0134】

図 8 は、本実施形態の別のチップを模式的に表す上面図である。

【0135】

図 8 に示すように、チップ 53 b は、図 7 に示すチップ 53 a と同様に、サンプル注入口 70 と、DNA 抽出槽 71 と、DNA 精製槽 72 と、PCR 槽 73 と

、ピロリン酸検出装置 50 と、DNA 抽出槽 71 と DNA 精製槽 72 とを接続する流路 74 a と、DNA 精製槽 72 と PCR 槽 73 とを接続する流路 74 b と、PCR 槽 73 とピロリン酸検出装置 50 とを接続する流路 74 c とを備えている。特に、流路 74 b が二股に別れており、PCR 槽 73 と、ピロリン酸検出装置 50 と、PCR 槽 73 とピロリン酸検出装置 50 とを接続する流路 74 c が 2 つずつ設けられている。

【0136】

チップ 53 b を用いて、2 つの PCR 槽 73 にそれぞれ異なるタイピングプライマーを導入することによって、同時に 2 つの SNP 部位の塩基種を判別することが可能である。

【0137】

図 9 は、本実施形態の更に別のチップ（縦型チップ）を模式的に表す斜視図である。

【0138】

図 9 に示すように、チップ 90 は、サンプル導入部 91 と、DNA 精製部 92 と、PCR 部 93 と、ピロリン酸検出装置 50 とを備えている。

【0139】

サンプル導入部 91 は、サンプル導入槽 91 a と DNA 抽出カラム 91 b とを有する。血液、唾液、毛髪および毛根などを必要に応じて薬液処理した試料溶液は、サンプル導入槽 91 a に注入され、DNA 抽出カラム 91 b を通過する。なお、血液、唾液などの液体は、薬液処理せずにサンプル導入槽 91 a に注入してもよい。

【0140】

DNA 精製部 92 は、DNA 精製槽 92 a と DNA 精製カラム 92 b とを有する。DNA 抽出カラム 91 b を通過した試料溶液は、DNA 精製槽 92 a に導入され、続いて DNA 精製カラム 92 b を通過する。

【0141】

PCR 部 93 は、PCR 槽 93 a と隔離部材 93 b とを有する。DNA 精製カラム 92 b を通過することによって精製された DNA を含む試料溶液は、PCR

槽 93 a に導入され、DNA、タイピングプライマー、DNA ポリメラーゼおよび 4 種類の d N T P を添加される。このことによって、P C R（プライマー伸長反応）が起こる。

【0142】

隔離部材 93 b は、上記塩基配列判別装置 60 の反応手段 51 により開閉できる構成となっている。P C R 槽 93 a において P C R が終了すると、反応手段 51 は、隔離部材 93 b を開放し、試料溶液をピロリン酸検出装置 50 に通過させる。

【0143】

ピロリン酸検出装置 50 は、上記説明の通りの構成であるので、ここでは説明を省略する。なお、ピロリン酸検出装置 50 の代わりに、H⁺濃度の変化を光学的変化あるいは電気的变化に変換し、その光学的変化あるいは電気的变化を検知できる装置を用いることが可能である。

【0144】

本実施形態では、ピロリン酸の量を測定することによって、プライマー伸張反応の進行の差を解析したが、勿論、プライマー伸張反応に限られず、試料溶液中に存在するピロリン酸の量を正確に測定することができる。

【0145】

また特に、プライマー伸張反応においては、H⁺-ピロホスファターゼは、A T P および d A T P が阻害剤となるため、試料溶液中に A T P または d A T P が存在し、且つピロリン酸の量が少ない場合、H⁺濃度はほとんど変化しない。逆にプライマー伸長反応によって試料溶液中の d A T P が消費され、且つピロリン酸の量が多い場合、H⁺濃度は大きく変化する。つまり、プライマー伸長反応の進行の差を、より大きな差として測定することが可能になる。従って、高精度で塩基種を判別することができる。

【0146】

（実施形態 2）

本実施形態では、試料中に特定の塩基配列を有する DNA が含まれるか否かを判別する方法、すなわち、特定の塩基配列を有する DNA の検出方法を説明する

。具体的には、4種類のdNTPを用いてプライマー伸長反応（例えば、PCR法、ICAN法、LCR法、SDA法、LAMP法等の増幅反応）を利用する方法を図10を参照しながら説明する。図10は、本実施形態の試料中に特定の塩基配列を有するDNAが含まれるか否かを判別する方法を表す工程図である。

【0147】

本実施形態の方法では、特定の塩基配列を有するDNAに相補的に結合可能な塩基配列を有するプライマーを用いる。

【0148】

まず、図10（a）に示す工程で、特定の塩基配列を有するDNAが含まれるか否かを判別したい溶液に、特定の塩基配列を有するDNAに相補的に結合可能な塩基配列を有するプライマー101、DNAポリメラーゼ8および4種類のdNTPを添加し、試料溶液100を調製する。なお、プライマー101は、特定の塩基配列を有する一本鎖DNAに完全にハイブリダイズするように設計されている。

【0149】

次に、図10（b）に示す工程で、試料溶液100の熱処理を行なう。このことによって、試料溶液100中に含まれているほとんどのDNAを一本鎖DNAとする。

【0150】

次に、図10（c）に示す工程で、試料溶液100を冷却する。このことによって、試料溶液100中に、特定の塩基配列を有するDNAから生成した一本鎖DNA102が存在する場合、一本鎖DNA102にプライマー101がハイブリダイズする。

【0151】

次に、図10（d）に示す工程で、試料溶液100の温度をプライマー伸長反応に最適な温度に調節する。一本鎖DNA102が存在する場合、一本鎖DNA102にプライマー101がハイブリダイズするので、プライマー伸長反応が起こる。このため、DNAポリメラーゼ8によってdNTPが消費され、ピロリン酸が生成する。

【0152】

なお、このとき、特定の塩基配列を有する一本鎖DNA 102が存在しない場合、プライマー101はハイブリダイズできない。このため、プライマー伸長反応は起こらない。従って、dNTPはほとんど消費されず、ピロリン酸はほとんど生成されない。

【0153】

次に、ピロリン酸の生成量を測定することによって、プライマー伸張反応の進行の差を解析する。このことによって、特定の塩基配列を有するDNAの有無を判別できる。なお、本実施形態のピロリン酸の生成量の測定方法は、上記実施形態1と全く同様であり、ここでは説明を省略する。

【0154】

以上に述べたように、試料中の特定の塩基配列を有する核酸の増幅法において生成されるピロリン酸を、 H^+ -ピロホスファターゼを用いて H^+ 濃度変化を解析することによって、試料中における特定の塩基配列を有する核酸の有無を判別することができる。

【0155】

なお、本実施形態で説明した特定の塩基配列を有する核酸の有無を判別する方法は、上記実施形態1で説明したピロリン酸測定装置50、塩基配列判別装置60、ならびにチップ53a、53bまたは90を用いて実施することが可能である。

【0156】

上記実施形態1および2では、4種類のdNTPを用いてプライマー伸長反応を利用する方法を説明したが、勿論、従来の技術で図21および22を参照しながら説明した、1種類のdNTP（またはddNTP）を用いるプライマー伸長反応を利用することも可能である。また、タイピングプライマーを含む2種類以上のプライマーを用いるPCR法等の特定の塩基配列を有する核酸の増幅法を併用してもよい。つまり、解析対象となるSNP部位を含む塩基配列を有する核酸の増幅を H^+ -ピロホスファターゼを用いて解析し、SNP部位の塩基種の判別を行えばよい。

【0157】

勿論、上記実施形態1の方法によれば、SNP部位の塩基種の判別だけでなく、特定の塩基配列を判別することも可能である。

【0158】

また、上記実施形態1および2では、DNAの塩基配列中の塩基種の判定およびDNAの検出について説明したが、勿論、DNAに限られず、RNAの塩基配列中の塩基種の判定およびRNAの検出も同様に行なうことができる。さらに、試料として、一本鎖DNA、二本鎖DNAに関わらず用いることが可能である。

【0159】

【実施例】

(実施例1)

本実施例を、Shizuo Yoshidaらの方法(Masayoshi Maeshima and Shizuo Yoshida、1989年、J. Biol.Chem.、264(33)、20068-20073ページ)に準じて以下に示すように行なった。

【0160】

まず、ヤエナリ由来の液胞膜からなる膜小胞をTris/Mesバッファー(濃度5mM、pH7.0)、sorbitol(濃度0.25M)、DTT(濃度2mM)からなる溶液中に溶かし液胞膜からなる膜小胞の懸濁液とした。

【0161】

次に、この懸濁液を、MgSO₄(濃度1mM)、KCl(濃度50mM)、sorbitol(濃度0.25M)、アクリジンオレンジ(pH感受性色素、濃度3μM)、Hepes/Bristris propane(濃度25mM、pH7.2)からなる反応液中に混合し、H⁺-ピロホスファターゼ液とした。

【0162】

次に、このH⁺-ピロホスファターゼ液を4本のチューブに均等に分注し、これらに対してピロリン酸ナトリウムの各最終濃度がそれぞれ10μM、20μM、40μM、60μM、80μMおよび100μMとなるようにピロリン酸ナト

リウム溶液を添加し、ピロリン酸の H^+ -ピロホスファターゼによる加水分解反応を開始した。

【0163】

本実施例では、上記の各反応液に 493 nm の励起光を照射し、ピロリン酸ナトリウム溶液を添加する前後における 540 nm の蛍光強度の変化を解析した。その結果を図 11 に示す。

【0164】

図 11 は、ピロリン酸ナトリウムの濃度と、540 nm の蛍光強度の変化との関係を表すグラフである。ここでは、540 nm の蛍光強度の変化を、各ピロリン酸ナトリウム濃度に対応する反応液における単位秒当たりの消光率で表している。なお、ピロリン酸ナトリウムの最終濃度が 100 μM の反応液における単位秒当たりの消光率を 100 として、各ピロリン酸ナトリウム濃度に対応する反応液における単位秒当たりの消光率を換算している。

【0165】

図 11 に示すように、ピロリン酸ナトリウムの濃度に依存してアクリジンオレンジの 1 秒当たりの消光率がほぼ双曲線関数の関係で変化するという結果が得られた。このことから、本方法によりピロリン酸の量を測定できることがわかる。

【0166】

(実施例 2)

本実施例を、Masasuke Yoshida 等の方法 (Masah. Sato, Masahiko Kasahara, Noriyuki Ishii, Haruo Homareda, Hideo Matsui および Masasuke Yoshida, 1994 年、J. Biol. Chem., 269 (9)、6725-6728 ページ) に準じて以下に示すように行なった。

【0167】

まず、カボチャの種から液胞膜 H^+ -ピロホスファターゼの精製を行なった。

【0168】

続いて、大豆のホスファチジルコリンとコレステロールとから調製した脂質混合液に、精製して得られた液胞膜 H^+ -ピロホスファターゼを添加し、液胞膜 H^+

ーピロホスファターゼのプロテオリポソーム液を調製した。このプロテオリポソーム液を、sorbitol（濃度0.25M）、Tricine-Na（濃度10mM、pH7.5）、EGTA（濃度0.1mM）、KCl（濃度50mM）、オクソノールV（膜電位感受性色素、濃度0.2 μ M）からなる反応液中に混合した後、5本のチューブに均等に分注した。

【0169】

続いて、5本のチューブにピロリン酸ナトリウムの最終濃度がそれぞれ10 μ M、20 μ M、40 μ M、60 μ M、80 μ Mおよび100 μ Mとなるようにピロリン酸ナトリウム溶液を添加し、ピロリン酸のH⁺ーピロホスファターゼによる加水分解反応を開始した。

【0170】

本実施例では、上記の各反応液に610nmの励起光を照射し、ピロリン酸ナトリウム溶液を添加する前後における639nmの蛍光強度の変化を測定することによって、ピロリン酸ナトリウム溶液の添加前後における各反応液に含まれるプロテオリポソームの膜電位変化について解析した。その結果を図12に示す。

【0171】

図12は、ピロリン酸ナトリウムの濃度と、639nmの蛍光強度の変化との関係を表すグラフである。ここでは、639nmの蛍光強度の変化を、各ピロリン酸ナトリウム濃度に対応する反応液における単位秒当たりの消光率で表している。なお、ピロリン酸ナトリウムの終濃度が100 μ Mの反応液における単位秒当たりの消光率を100として、各ピロリン酸ナトリウム濃度に対応する反応液における単位秒当たりの消光率を換算している。

【0172】

図12に示すように、ピロリン酸ナトリウムの濃度に依存してオクソノールVの1秒当たりの消光率がほぼ双曲線関数の関係で変化するという結果が得られた。このことから、本方法によりピロリン酸の量を測定できることがわかる。

【0173】

（実施例3）

本実施例は、特許第3213341号公報に開示された方法に準じて行なった

。

【0174】

まず、上記実施例2と同様にカボチャの種由来の液胞膜H⁺-ピロホスファターゼを用い、市販のISFET-pHセンサ上に液胞膜H⁺-ピロホスファターゼを含む脂質二重層を固定した。ただし、脂質二重層の外部はMgSO₄（濃度1 mM）、KCl（濃度50 mM）、sorbitol（濃度0.25 M）、Hepes/Bristris propane（濃度25 mM、pH 7.2）からなる反応溶液によって満たした。

【0175】

次に、上述した液胞膜H⁺-ピロホスファターゼを含む脂質二重層が固定されたISFET-pHセンサを用いて、上記反応溶液中のピロリン酸ナトリウムの最終濃度がそれぞれ20 μM、40 μM、60 μM、80 μMおよび100 μMとなるようにピロリン酸ナトリウム溶液を添加した場合の各pH値を測定した。その結果を図13に示す。

【0176】

図13に示すように、ピロリン酸ナトリウムの濃度に依存してpH値が減少していく結果が得られた。このことから、本方法によってピロリン酸の量を測定できることがわかる。

【0177】

（実施例4）

本実施例では、試料中におけるλDNA（λDNAの全塩基配列は、GenBankデータベースのAccession No. V00636、J02459、M17233、X00906を参照）の検出を行なった。

【0178】

まず、λDNA（宝酒造（株）製）が10 ng/μLの濃度で蒸留水中に溶解されている試料液A、および蒸留水のみからなる試料液Bを用意した。また、図14（a）に示すように、λDNAの特定の塩基配列に完全にハイブリダイズし得る2種類のプライマーCおよびプライマーDをそれぞれ蒸留水に溶かしたプライマー溶液EおよびF（いずれも20 μM）を用意した。

【0179】

上記試料液AおよびBそれぞれに、T a K a R a L a T a q (5 U/μL、宝酒造(株)製)、T a K a R a L a T a qの専用バッファーである2×G C b u f f e r I (宝酒造(株)製)、d N T P m i x t u r e (各濃度2.5 mM、宝酒造(株)製)、ならびにプライマー溶液EおよびFを添加して、図14(b)に示す組成のP C R反応液GおよびHを調製した。

【0180】

次に、P C R反応液GおよびHのそれぞれについて、図14(c)に示す反応温度条件でP C R反応を行なった。

【0181】

P C R反応終了後、P C R反応液GおよびHのそれぞれを、上記実施例1に記載のH⁺-ピロホスファターゼ液と混合し反応させた。

【0182】

本実施例では、P C R反応液GおよびHのそれぞれについて、H⁺-ピロホスファターゼ液を混合する前後におけるアクリジンオレンジの蛍光強度変化について解析した。アクリジンオレンジの蛍光強度解析については、493 nmの励起光を照射し540 nmの蛍光強度について解析した。その結果を図15(a)に示す。

【0183】

図15(a)は、P C R反応液GおよびHのそれぞれに、H⁺-ピロホスファターゼ液を混合する前後における蛍光強度変化率を示している。なお、蛍光強度変化率は、図15(b)に示す式で表される。

【0184】

図15(a)に示すように、P C R反応液Gの方が、P C R反応液Hよりも明らかに蛍光強度変化率が高い。つまり、P C R反応液Gでは、プライマー伸長反応が進行したことがわかる。従って、本方法により標的核酸の検出ができることがわかる。

【0185】

(実施例5)

本実施例では、 λ DNA の塩基配列内におけるある塩基を人為的に他の塩基に置換した変異型 λ DNA を作製し、通常の λ DNA と変異 λ DNA とを判別できるか否かについて検討した。

【0186】

まず、 λ DNA (宝酒造 (株) 製) を用いて変異型 λ DNA を作製した。変異型 λ DNA は、図 16 に示した λ DNA (以下、通常の λ DNA のことを野性型 λ DNA と記す) の二本鎖 DNA 配列内に存在する GC 塩基対 (図中の領域 R_1) を当業者に周知の方法で人為的に AT 塩基対 (図中の領域 R_2) に置換した。

【0187】

次に、野性型 λ DNA および変異型 λ DNA のそれぞれを最終濃度 $10 \text{ ng} / \mu\text{L}$ となるように蒸留水に溶解したものをそれぞれ野性型 λ DNA 液および変異型 λ DNA 液とした。

【0188】

次に、上記の塩基の違いを判別するために、図 16 (a) に示すタイピングプライマーを用意した。続いて、タイピングプライマーを最終濃度 $20 \mu\text{M}$ となるように蒸留水に溶解したタイピングプライマー溶液を調製した。

【0189】

なお、図 16 (a) に示すタイピングプライマーは、野性型 λ DNA の下の段に記した一本鎖 DNA に完全にハイブリダイズする。しかし、このタイピングプライマーの 3' 末端の G は、変異 λ DNA の下の段に記した一本鎖 DNA にハイブリダイズできない。従って、このタイピングプライマーを用いてプライマー伸長反応を行なうと、野性型 λ DNA の場合は良好に反応が進行するが、変異 λ DNA の場合は反応があまり進行しない。

【0190】

また、上記実施例 4 で用いたプライマー溶液 F も用意した。

【0191】

次に、野性型 λ DNA 液および変異型 λ DNA 液のそれぞれについて、T a K a R a T a q ($5 \text{ U} / \mu\text{L}$ 、宝酒造 (株) 製)、および T a K a R a T a q 専用の $10 \times \text{PCR buffer}$ (宝酒造 (株) 製)、および d N T P m i

x t u r e (各濃度2.5 mM、宝酒造(株)製)、およびタイピングプライマー溶液およびプライマー溶液Fを用いて、図16(b)に示す組成のPCR反応液IおよびJを調製した。

【0192】

次に、PCR反応液IおよびJにおいて、それぞれ図16(c)に示す反応温度条件でPCR反応を行なった。

【0193】

PCR反応終了後、PCR反応液IおよびJを、それぞれH⁺-ピロホスファターゼ・リポソーム液と混合し反応させた。H⁺-ピロホスファターゼ・リポソーム液は、Masasuke Yoshida等の方法(Masa H. Sato、Masahiko Kasahara、Noriyuki Ishii、Haruo Homareda、Hideo Matsui and Masasuke Yoshida.、1994年、J. Biol. Chem.、269(9)、6725-6728ページ)に準じて調製した。

【0194】

具体的には、まず、カボチャの種から液胞膜H⁺-ピロホスファターゼの精製を行なった。続いて、大豆のホスファチジルコリンとコレステロールとから調製した脂質混合液に、精製して得られた液胞膜H⁺-ピロホスファターゼを添加し、液胞膜H⁺-ピロホスファターゼのプロテオリポソーム液を調製した。このプロテオリポソーム液を、sorbitol(濃度0.25M)、Tricine-Na(濃度10mM、pH7.5)、EGTA(濃度0.1mM)、KCl(濃度50mM)、オクソノールV(膜電位感受性色素、濃度0.2μM)からなる反応液中に混合し、これをH⁺-ピロホスファターゼ・リポソーム液とした。

【0195】

本実施例では、上記の各PCR反応液に610nmの励起光を照射し、ピロリン酸ナトリウム溶液を添加する前後におけるオクソノールVの639nmの蛍光強度の変化を測定することによって、各反応液に含まれるプロテオリポソームの膜電位変化について解析した。その結果を図17に示す。

【0196】

図17は、PCR反応液IおよびJのそれぞれの混合前後における蛍光強度変化率を示している。図17に示すように、PCR反応液Iの方が、変異型PCR反応液Jよりも明らかに蛍光強度変化率が高い。これは、PCR反応液JではPCR反応が良好に進行しなかったが、PCR反応液Iは良好に進行し、その結果、生成されたピロリン酸がリポソームに存在する H^+ -ピロホスファターゼと反応し、リポソーム内に H^+ が輸送されたためと考えられる。

【0197】

従って、本実施例によれば、DNAの特定の塩基配列中の1塩基対の違いを判別できることがわかる。すなわち、本実施例は、本発明の方法が、SNP部位の塩基種の判別、突然変異による1塩基対の変異など、特定の塩基配列を判別するために非常に有効であることを示すものである。

【0198】

(実施例6)

本実施例では、上記実施例5とは異なり、1塩基伸長反応と H^+ -ピロホスファターゼの反応とを組み合わせた方法で、野生型 λ DNAと変異型 λ DNAとの間の1塩基対の違いを判別できるか否かについて検討した。

【0199】

まず、上記実施例5で用いたものと同じ野生型 λ DNAおよび変異型 λ DNAをそれぞれ終濃度が5mMとなるように蒸留水に溶解した野生型 λ DNA(5mM)液および変異型 λ DNA(5mM)液を調製した。

【0200】

次に、図18(a)に示すプライマーを用意した。このプライマーは、実施例5で、図16(a)に示した野生型 λ DNAの下段側の一本鎖DNAに、5'末端のCを除く配列に対して完全にハイブリダイズし得る。すなわち、実施例5で示した変異型 λ DNA配列の下段側の一本鎖DNA配列においても同様に、5'末端のTを除く配列に対して完全にハイブリダイズし得る。

【0201】

次に、このプライマーを、最終濃度0.2mMとなるように蒸留水に溶かしたプライマー溶液Mを調製した。

【0202】

続いて、野性型 λ DNA (5 mM) 液および変異型 λ DNA (5 mM) 液それぞれについて、T a K a R a T a q (5 U/ μ L、宝酒造(株)製)、および T a K a R a T a q 専用の 10 \times PCR buffer (宝酒造(株)製)、および 2.5 mM の d A T P 溶液、およびプライマー溶液 M を用いて、図 18 (b) に示す組成の伸長反応液 K および L を調製した。

【0203】

続いて、伸長反応液 K および L のそれぞれについて、図 18 (c) に示す反応温度条件で 1 塩基伸長反応を行なった。

【0204】

1 塩基伸長反応終了後、各伸長反応液を H⁺-ピロホスファターゼを固定した修飾 I S F E T 電極に導入した。修飾 I S F E T 電極は、上記実施例 3 で用いたものである。

【0205】

この修飾 I S F E T 電極を用いて、各伸長反応液を添加した場合の各 pH 値を測定した。その結果、伸長反応液 K の pH は 6.89 であったのに対し、伸長反応液 L の pH は 6.02 であった。この結果は、野性型 λ DNA を含む伸長反応液 K では伸長反応が起きなかったが、変異型 λ DNA を含む伸長反応液 L では d A T P による 1 塩基伸長反応が起こり、その結果、生成されるピロリン酸が修飾 I S F E T 電極上の H⁺-ピロホスファターゼと反応し、H⁺が修飾 I S F E T 電極側に輸送されたためと考えられる。

【0206】

本方法によれば、標的核酸の塩基配列中の 1 塩基対の違いを判別できることがわかる。つまり、本方法は S N P 部位の塩基種の判別、突然変異による 1 塩基対の置換など、特定の塩基配列を判別するための非常に有効な方法であることがわかる。

【0207】

【発明の効果】

本発明によれば、ピロリン酸を測定する簡便な技術、ならびに標的核酸の塩基

配列の検出および判定技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、実施形態 1 の試料中の標的 DNA の SNP 部位の塩基種を判別する方法を表す工程図である。

【図 2】

図 2 は、実施形態 1 の試料中の標的 DNA の SNP 部位の塩基種を判別する方法を表す工程図である。

【図 3】

図 3 は、 H^{+} -ピロホスファターゼを模式的に表す図である。

【図 4】

図 4 は、ピロリン酸の測定方法を表す図である。

【図 5】

図 5 は、ピロリン酸の測定装置を表す図である。

【図 6】

図 6 は、実施形態 1 の塩基配列判別装置を表す模式図である。

【図 7】

図 7 (a) は、実施形態 1 のチップを模式的に表す上面図であり、図 7 (b) は、図 7 に示した X-X 線に沿った断面図である。

【図 8】

図 8 は、実施形態 1 の別のチップを模式的に表す上面図である。

【図 9】

図 9 は、実施形態 1 の更に別のチップを模式的に表す斜視図である。

【図 10】

図 10 は、実施形態 2 の試料中に特定の塩基配列を有する DNA が含まれるか否かを検出する方法を表す工程図である。

【図 11】

図 11 は、ピロリン酸ナトリウムの濃度と、540 nm の蛍光強度の変化との関係を表すグラフである。

【図 1 2】

図 1 2 は、ピロリン酸ナトリウムの濃度と、639 nm の蛍光強度の変化との関係を表すグラフである。

【図 1 3】

図 1 3 は、ピロリン酸ナトリウムの濃度と pH 値との関係を表すグラフである。

【図 1 4】

図 1 4 (a) は、 λ DNA の特定の塩基配列に完全にハイブリダイズし得る 2 種類のプライマー C およびプライマー D を表す図であり、図 1 4 (b) は、PCR 反応液 G および H の組成を表す表であり、図 1 4 (c) は、PCR 反応を行なった反応温度条件を表すフローチャートである。

【図 1 5】

図 1 5 (a) は、PCR 反応液 G および H のそれぞれに、 H^+ -ピロホスファターゼ液を混合する前後における蛍光強度変化率を示すグラフであり、図 1 5 (b) は、蛍光強度変化率を示す式である。

【図 1 6】

図 1 6 (a) は、野生型 λ DNA、変異型 λ DNA およびタイピングプライマーを表す図であり、図 1 6 (b) は、PCR 反応液 I および J の組成を表す表であり、図 1 6 (c) は、PCR 反応を行なった反応温度条件を表すフローチャートである。

【図 1 7】

図 1 7 は、PCR 反応液 I および J のそれぞれの混合前後における蛍光強度変化率を示している。

【図 1 8】

図 1 8 (a) は、プライマーを表す図であり、図 1 8 (b) は、PCR 反応液 K および L の組成を表す表であり、図 1 8 (c) は、PCR 反応を行なった反応温度条件を表すフローチャートである。

【図 1 9】

従来のプライマー伸長反応を利用した SNP 部位の塩基種の判別技術を表す工

程である。

【図 2 0】

従来のプライマー伸長反応を利用した S N P 部位の塩基種の判別技術を表す工程である。

【図 2 1】

従来のプライマー伸長反応を利用した S N P 部位の塩基種の判別技術を表す工程である。

【図 2 2】

従来のプライマー伸長反応を利用した S N P 部位の塩基種の判別技術を表す工程である。

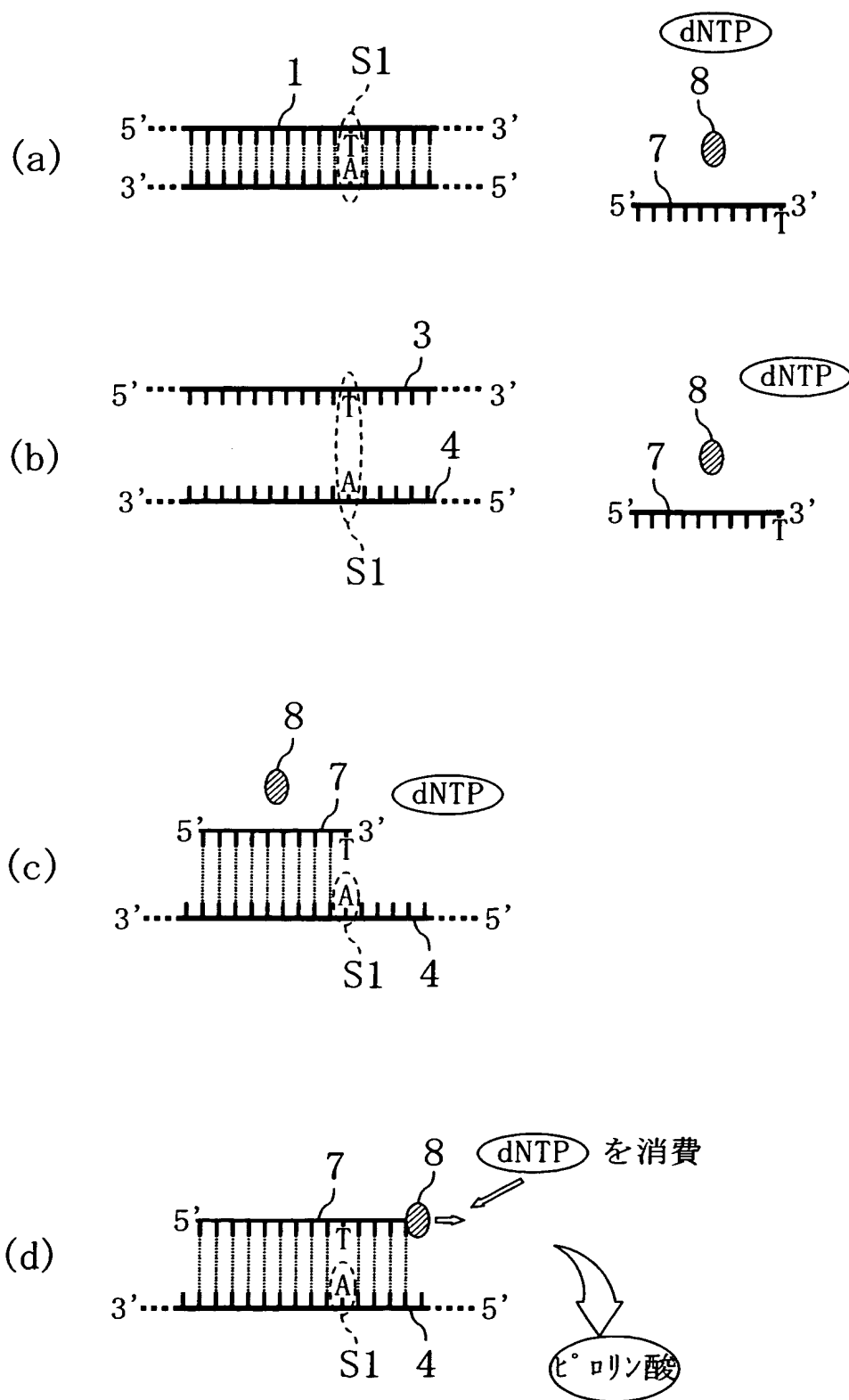
【符号の説明】

- 1、2 DNA
- 3、4、5、6 一本鎖 DNA
- 7 タイピングプライマー
- 8 DNAポリメラーゼ
- 10 ピロリン酸
- 11 H^+ -ピロホスファターゼ
- 12 リン酸
- 13 液胞膜
- 31 反応容器
- 32 試料溶液
- 33 膜小胞
- 34 容器
- 35 電極
- 36 内部槽
- 37 膜
- 38 H^+ 感受性電極
- 39 内部領域
- 50 ピロリン酸測定装置

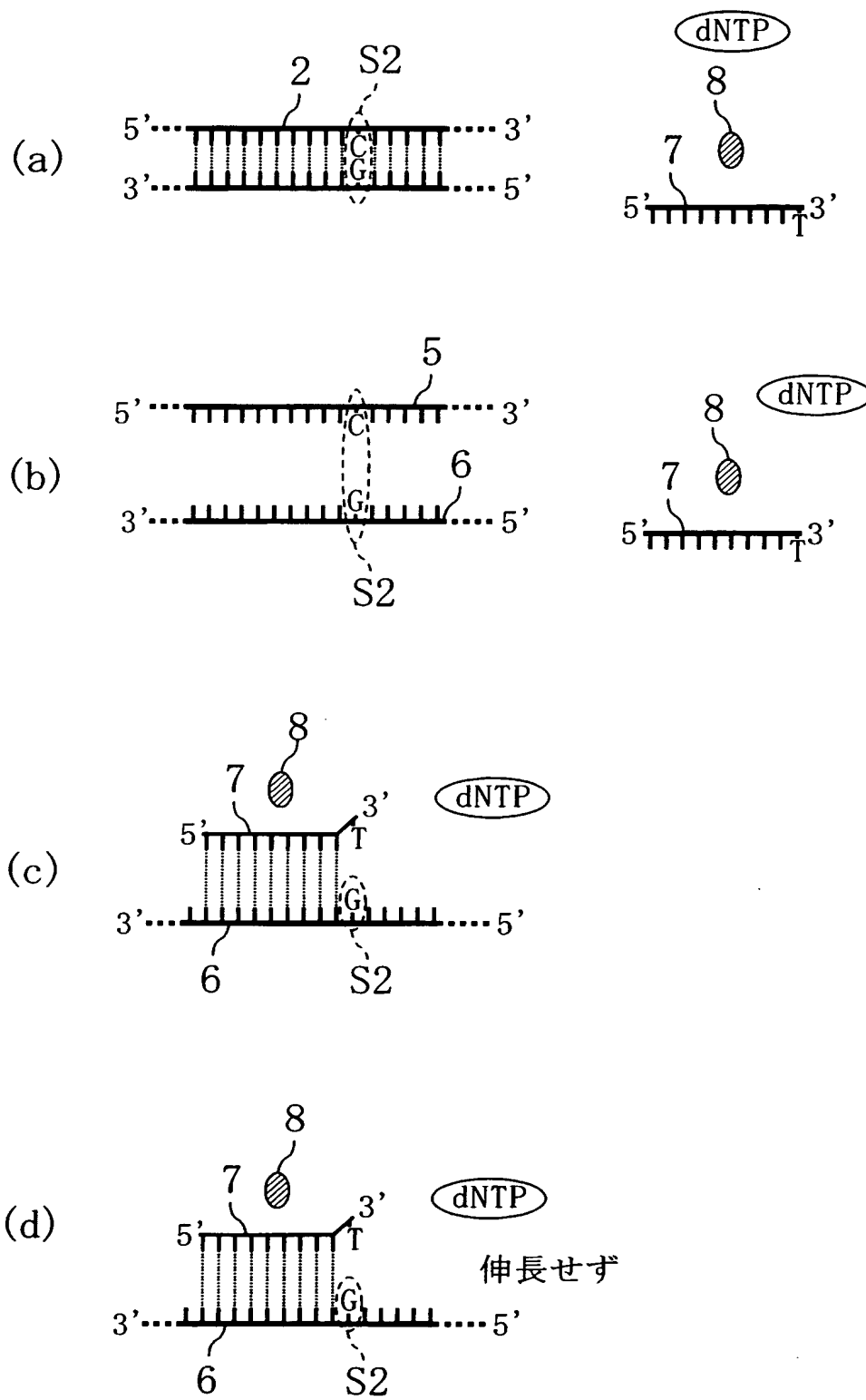
- 5 1 反応手段
 - 5 1 a 反応部
 - 5 1 b ピロリン酸測定部
- 5 2 解析手段
- 5 3、5 3 a、5 3 b、9 0 チップ
- 6 0 塩基配列判別装置
- 7 0 サンプル注入口
 - 7 1 DNA抽出槽
 - 7 2 DNA精製槽
 - 7 3 PCR槽
 - 7 4 a、7 4 b、7 4 c 流路
 - 7 5 開閉部材
- 9 1 サンプル導入部
 - 9 1 a サンプル導入槽
 - 9 1 b DNA抽出カラム
- 9 2 DNA精製部
 - 9 2 a DNA精製槽
 - 9 2 b DNA精製カラム
- 9 3 PCR部
 - 9 3 a PCR槽
 - 9 3 b 隔離部材
- 1 0 0 試料溶液
- 1 0 1 プライマー
- 1 0 2 一本鎖DNA

【書類名】 図面

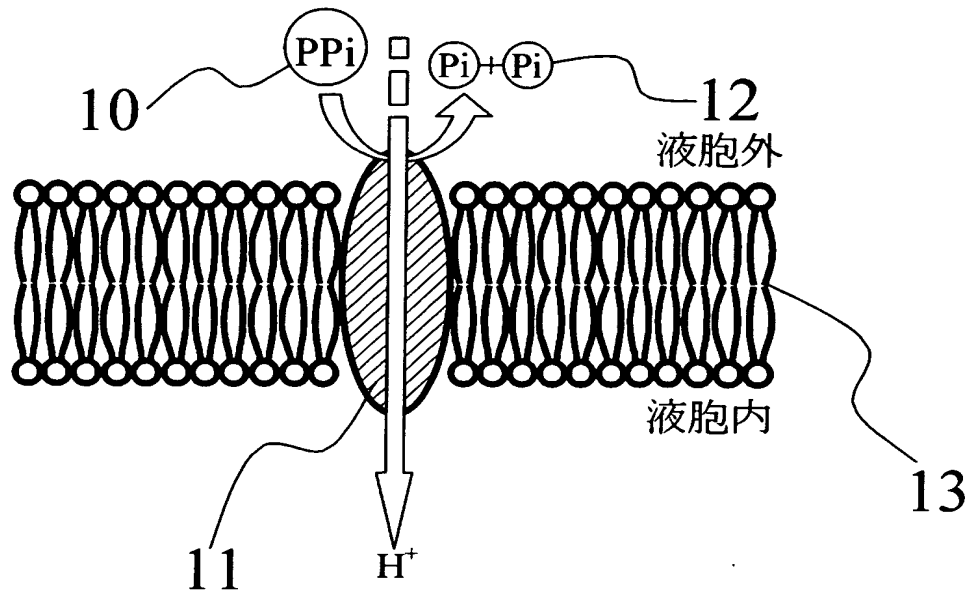
【図 1】



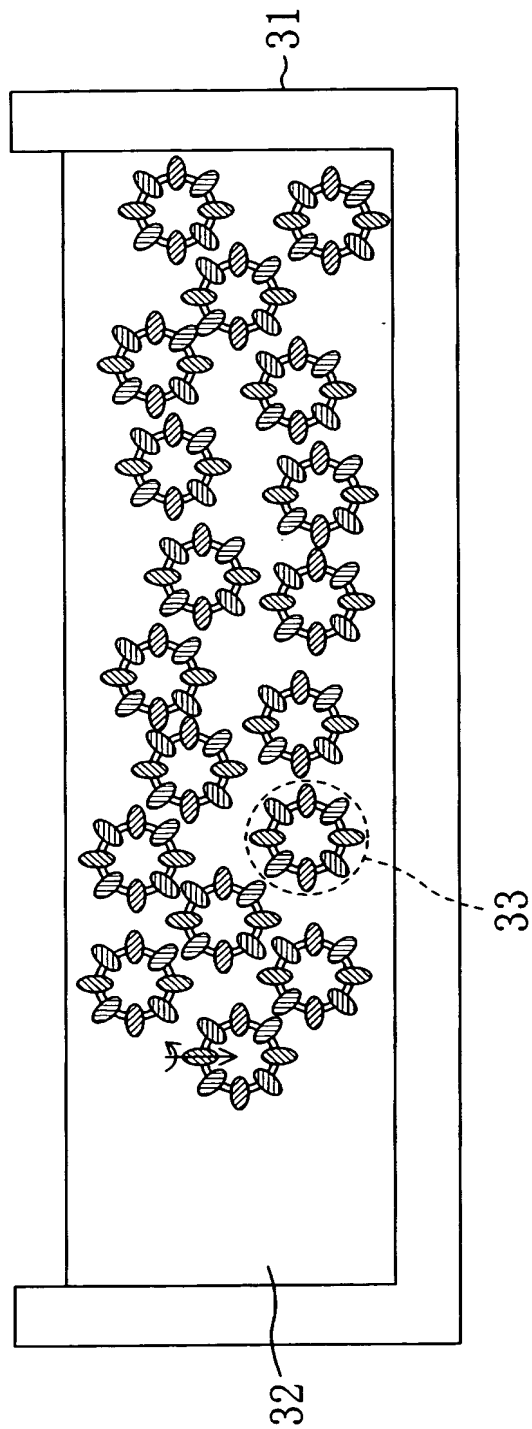
【図 2】



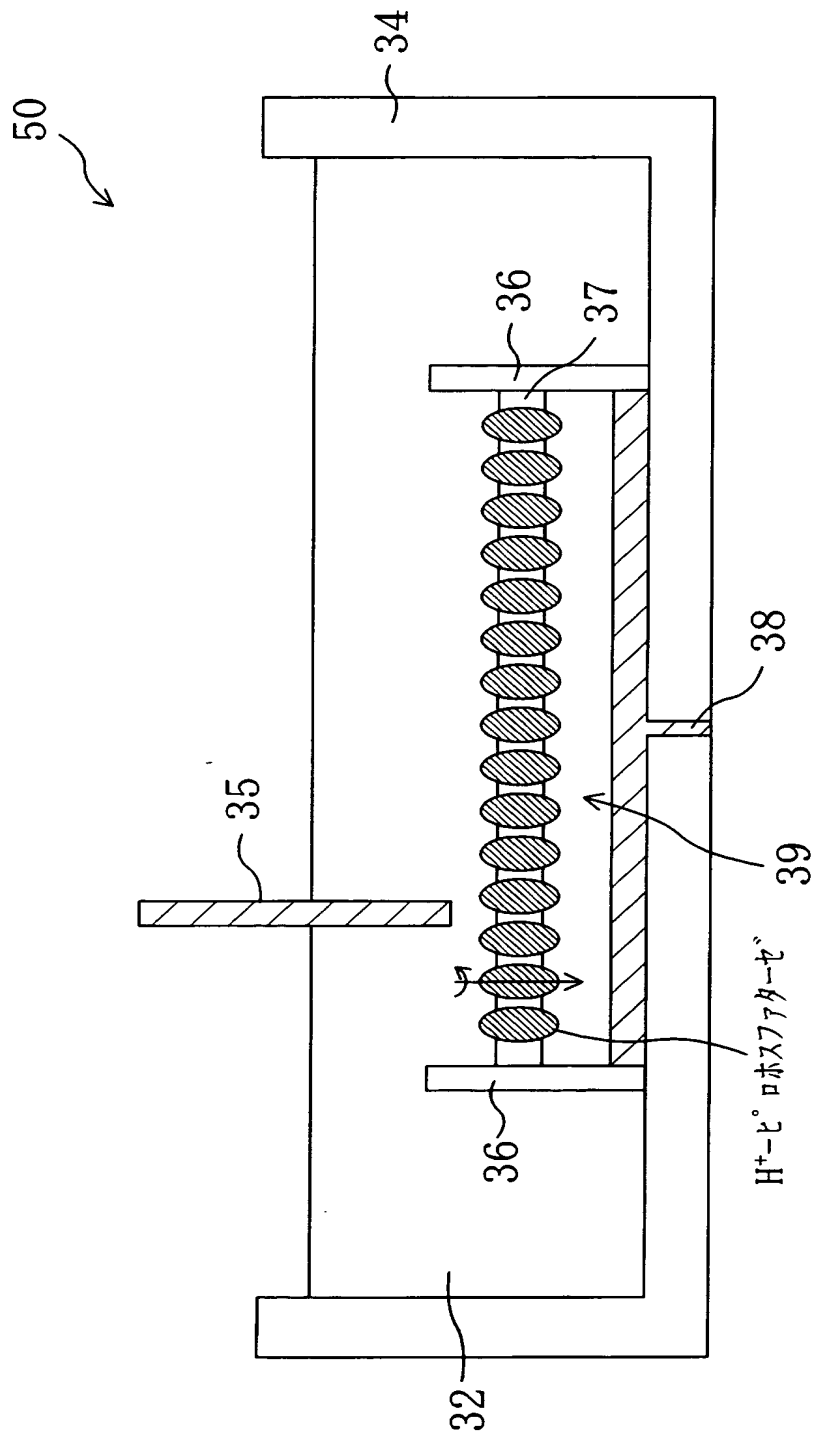
【図 3】



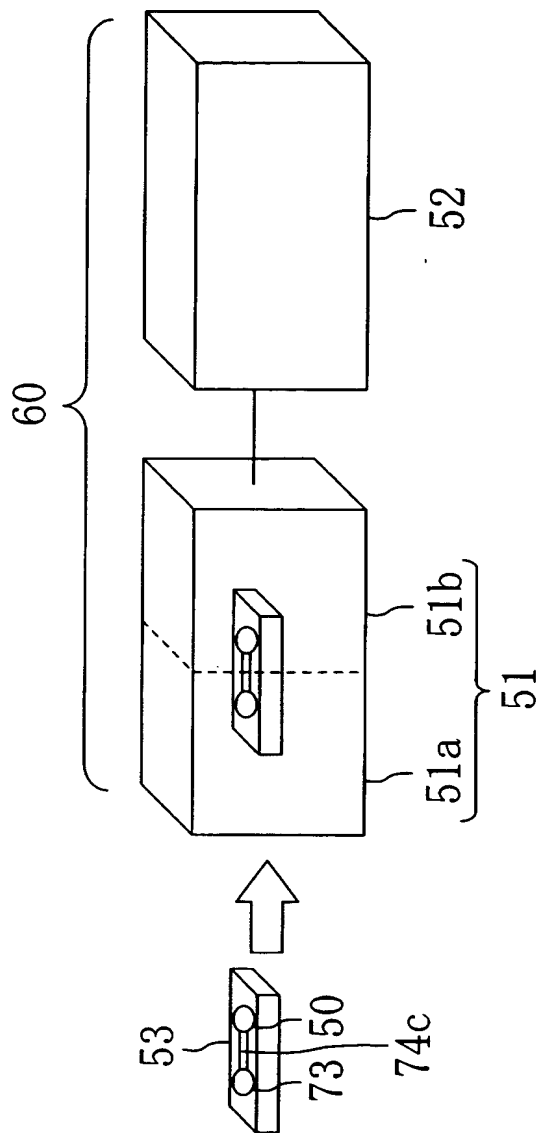
【図 4】



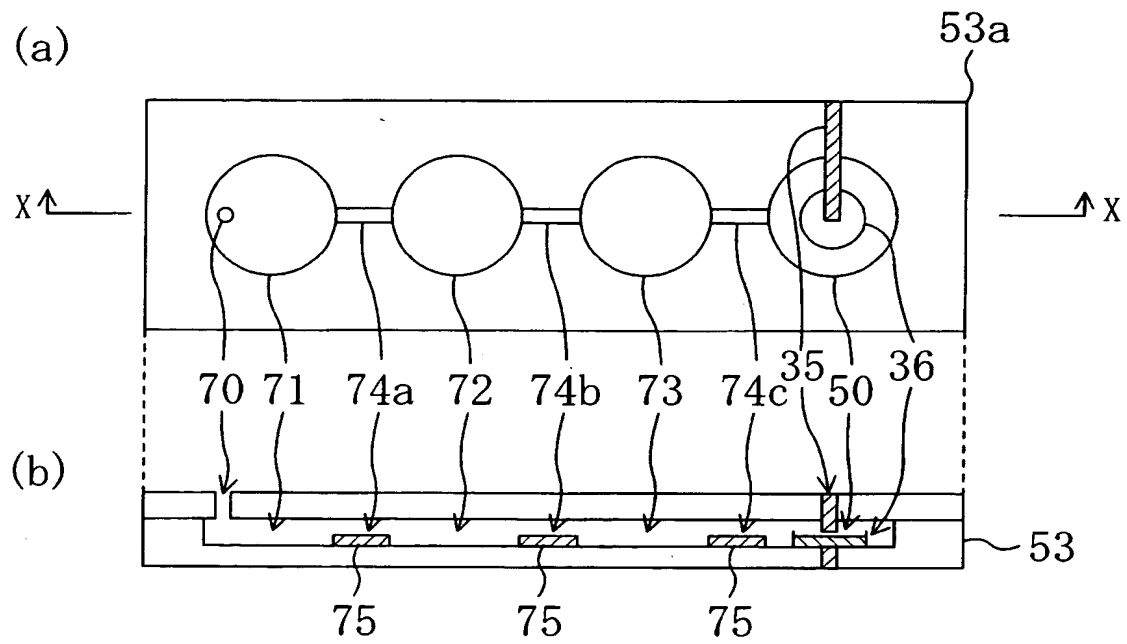
【図 5】



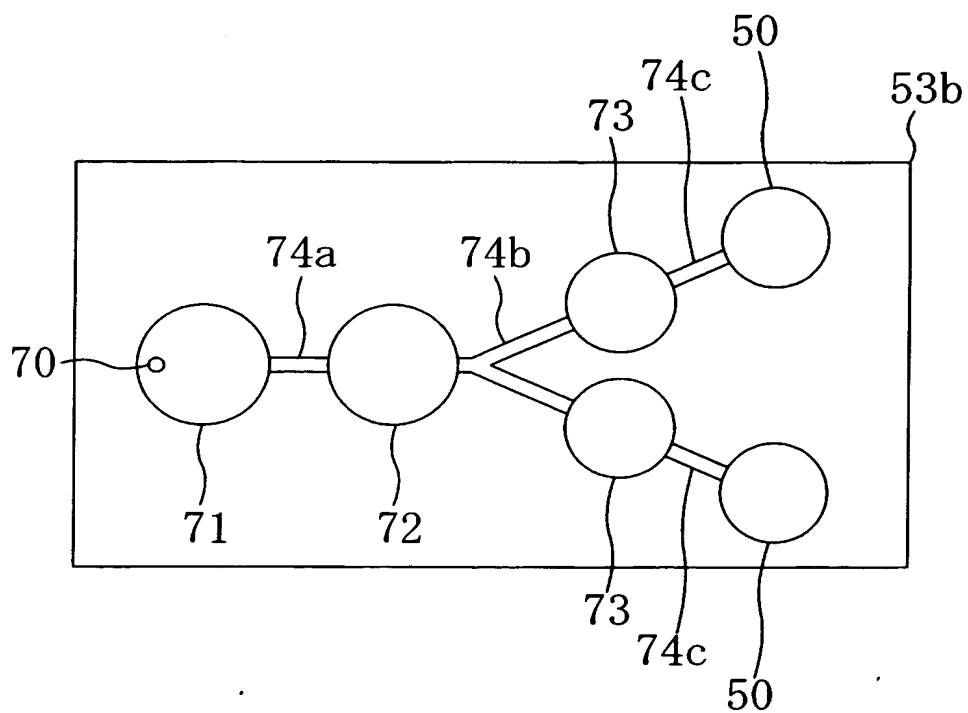
【図 6】



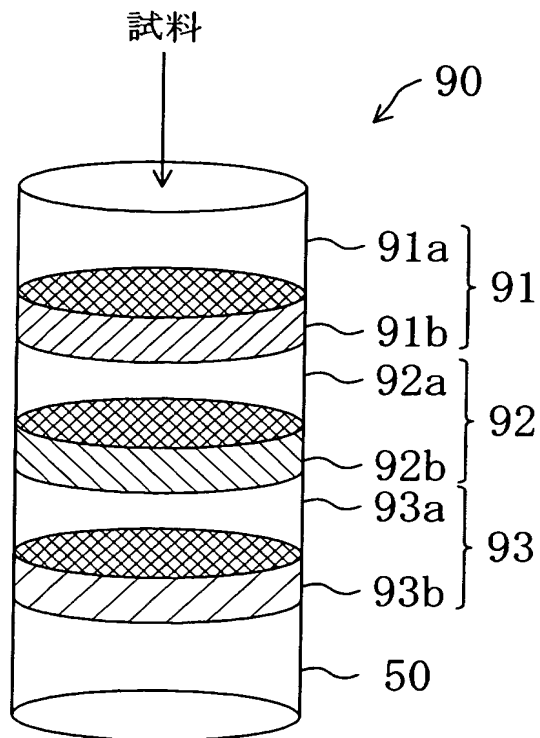
【図 7】



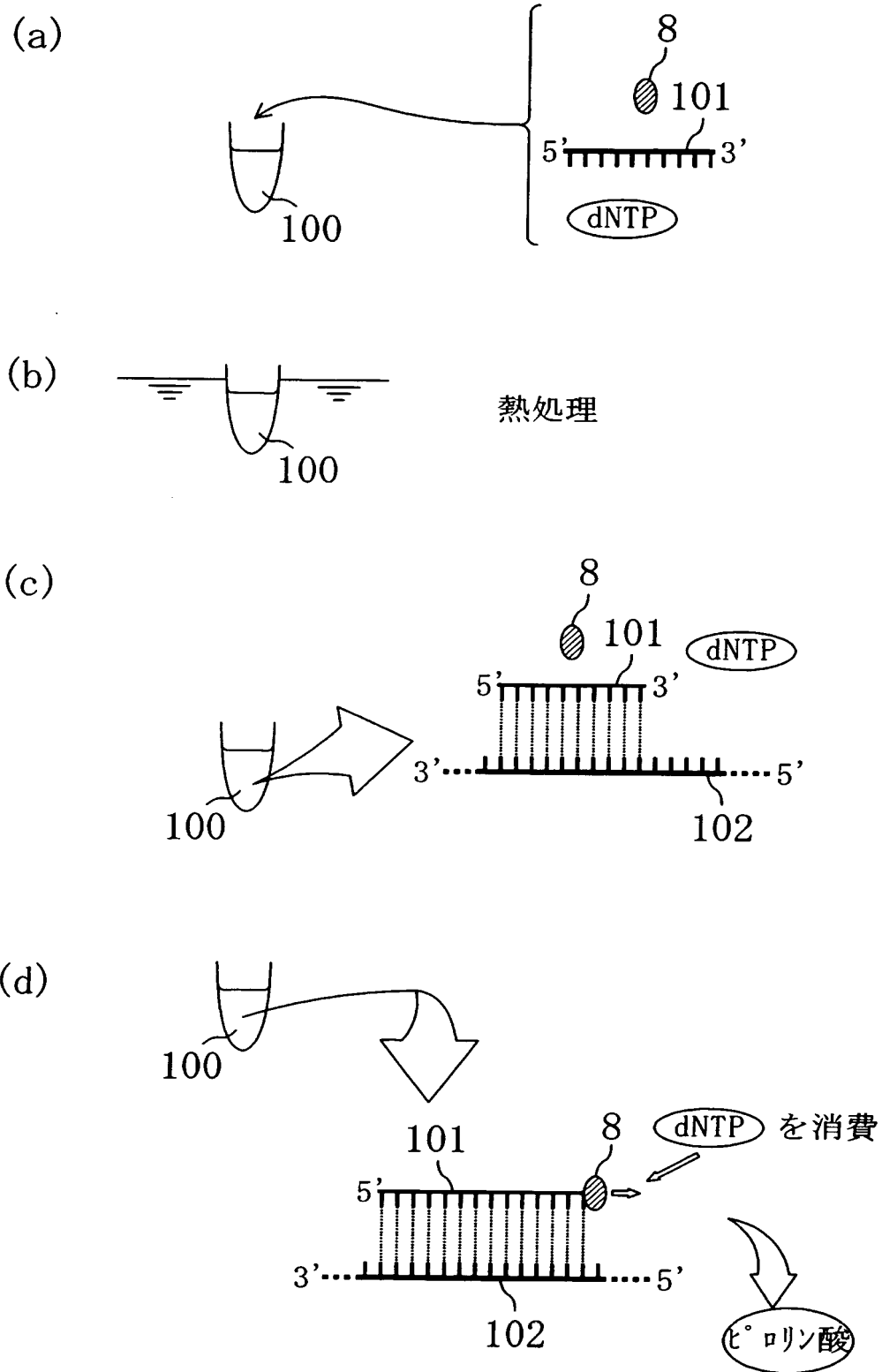
【図 8】



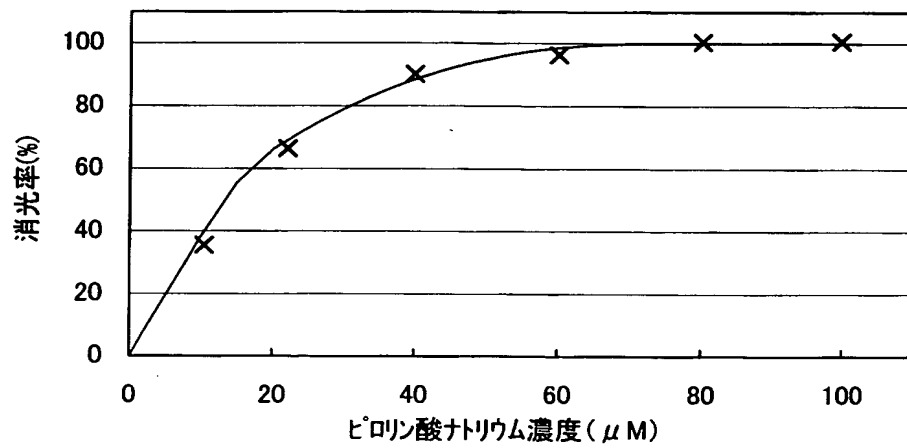
【図 9】



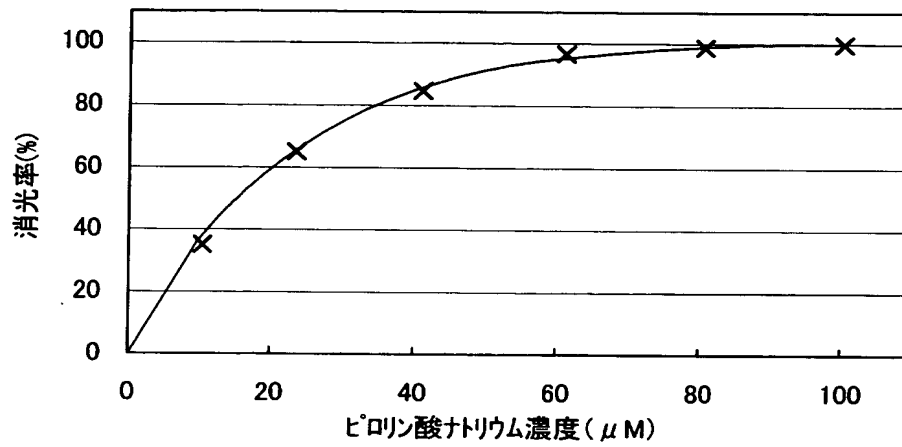
【図 10】



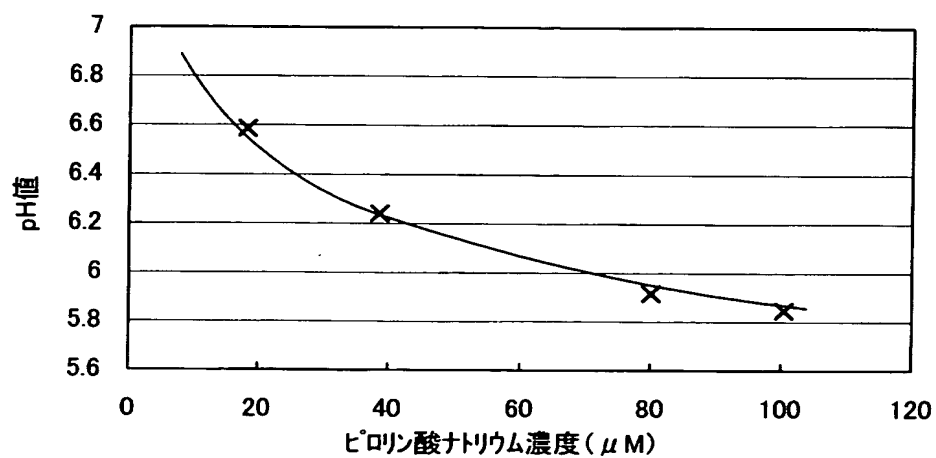
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



【図 14】

(a) プライマーC

5' GATGAGTTCGTGTCCGTACAACCTGG 3'

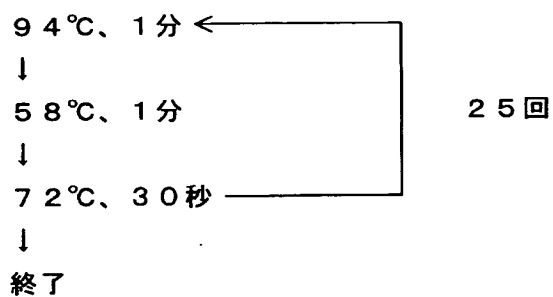
プライマーD

5' GAATCACGGTATCCGGCTGCGCTGA 3'

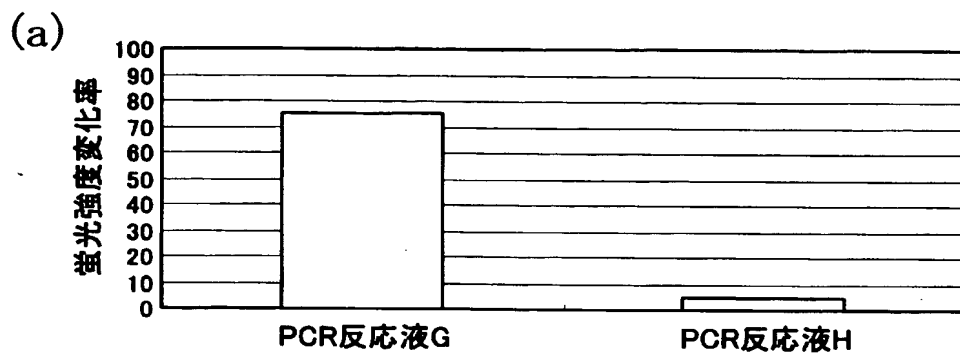
(b)

| | PCR反応液G | PCR反応液H |
|---------------|------------------|------------------|
| TaKaRa La Taq | 0.2 μ L | 0.2 μ L |
| 2xGC buffer I | 10 μ L | 10 μ L |
| dNTP mixture | 3.2 μ L | 3.2 μ L |
| 試料液AあるいはB | 4 μ L (試料液A) | 4 μ L (試料液B) |
| プライマー溶液E | 0.9 μ L | 0.9 μ L |
| プライマー溶液F | 0.9 μ L | 0.9 μ L |
| 蒸留水 | 0.8 μ L | 0.8 μ L |

(c)



【図 15】



(b)

$$\text{蛍光強度変化率} = \frac{\text{H}^+\text{-ATPase 液添加前後のPCR反応液の蛍光強度値の差}}{\text{H}^+\text{-ATPase 液添加前のPCR反応液の蛍光強度値}} \times 100$$

【図 16】

(a)

・ 野性型 λ DNA・ 変異型 λ DNA

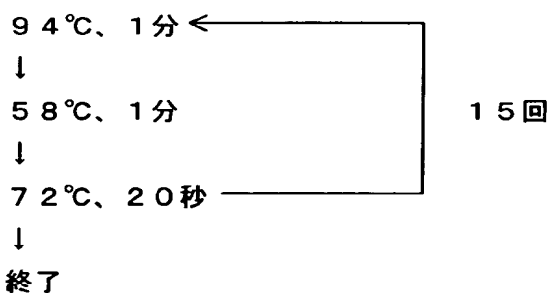
・ タイピングプライマー



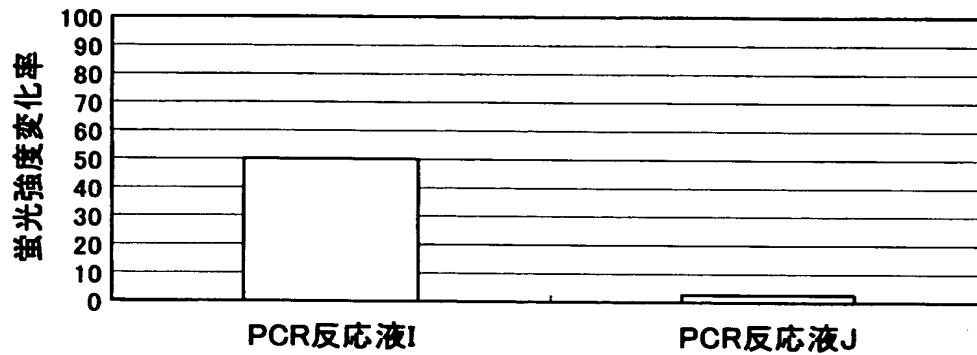
(b)

| | PCR反応液I | PCR反応液J |
|------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| TaKaRa Taq | 0.1 μ L | 0.1 μ L |
| 10 \times PCR buffer | 2 μ L | 2 μ L |
| dNTP mixture | 1.6 μ L | 1.6 μ L |
| 野性型 λ DNA 液あるいは 変異型 λ DNA 液 | 2 μ L (野性型 λ DNA 液) | 2 μ L (変異型 λ DNA 液) |
| タイピングプライマー溶液 | 0.9 μ L | 0.9 μ L |
| プライマー溶液F | 0.9 μ L | 0.9 μ L |
| 蒸留水 | 12.5 μ L | 12.5 μ L |

(c)



【図 17】



【図 18】

(a)

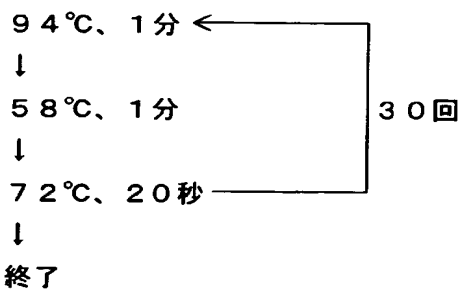
・プライマー 3

5' GATGAGTTCGTGTCCGTACAACT 3'

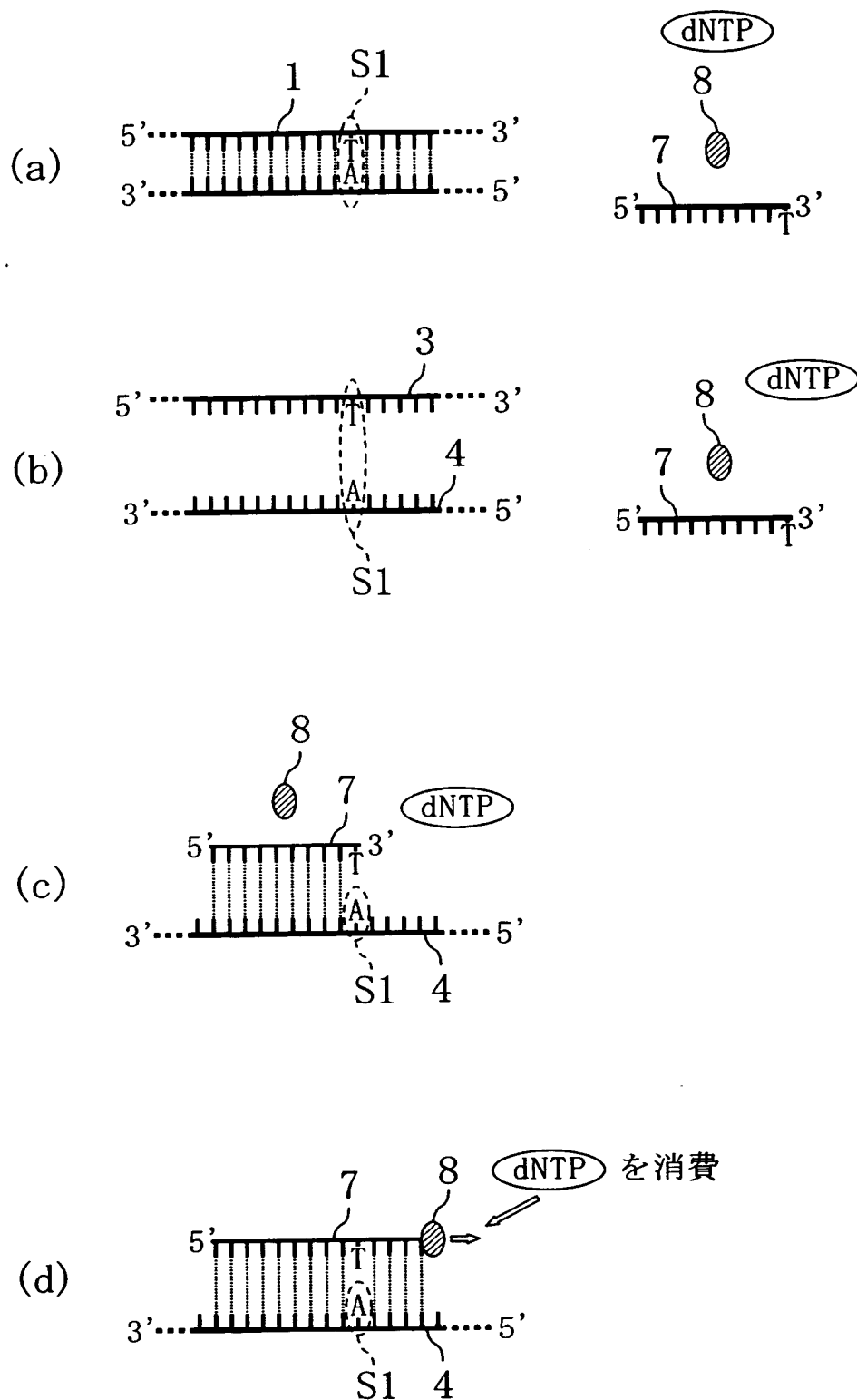
(b)

| | 伸長反応液 K | 伸長反応液 L |
|------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| TaKaRa Taq | 0.1 μ L | 0.1 μ L |
| 10 \times PCR buffer | 2 μ L | 2 μ L |
| dATP 溶液 | 1.6 μ L | 1.6 μ L |
| 野性型 λ DNA 液あるいは 変異型 λ DNA 液 | 8 μ L (野性型 λ DNA 液) | 8 μ L (変異型 λ DNA 液) |
| プライマー溶液 M | 0.9 μ L | 0.9 μ L |
| 蒸留水 | 12.5 μ L | 12.5 μ L |

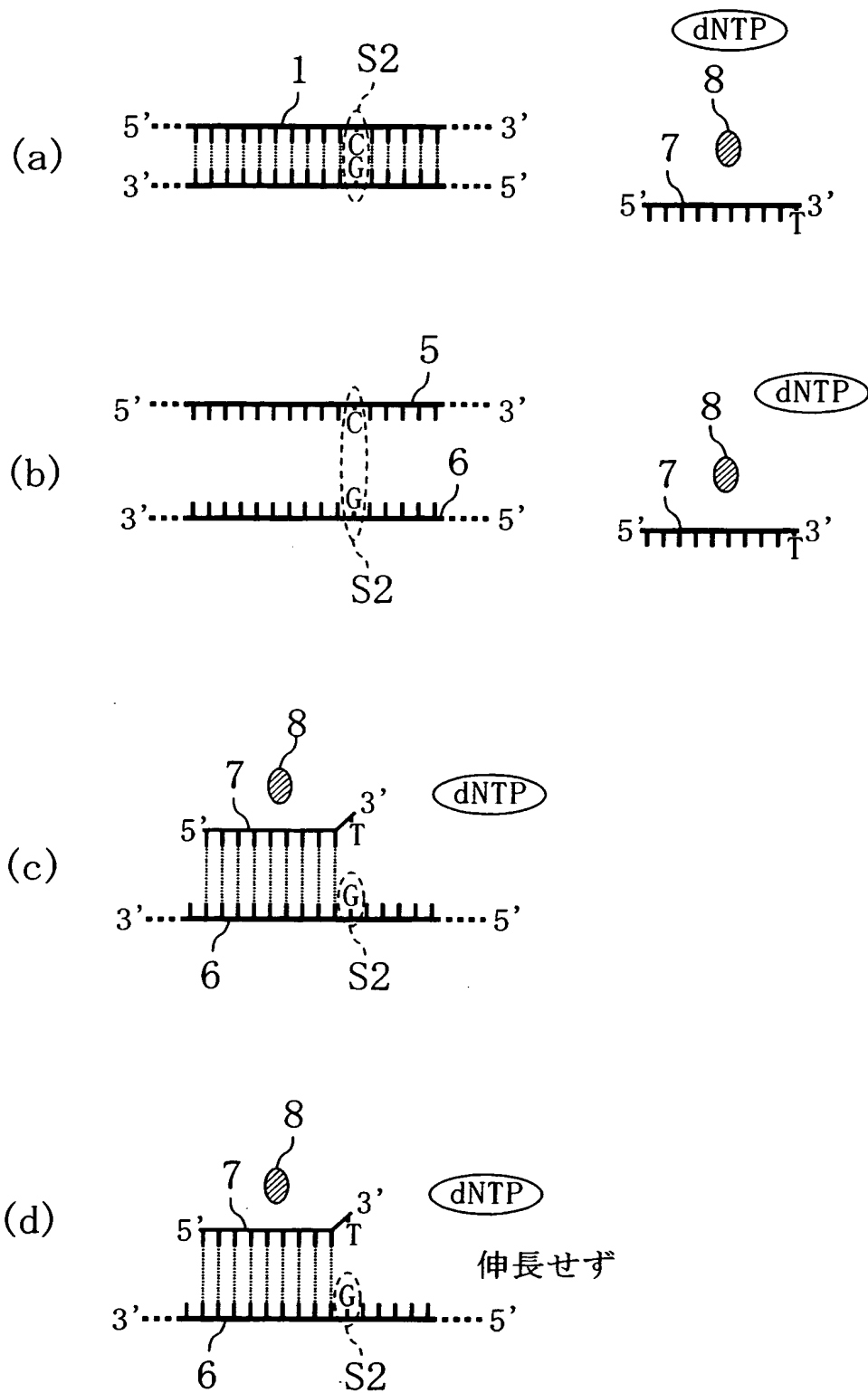
(c)



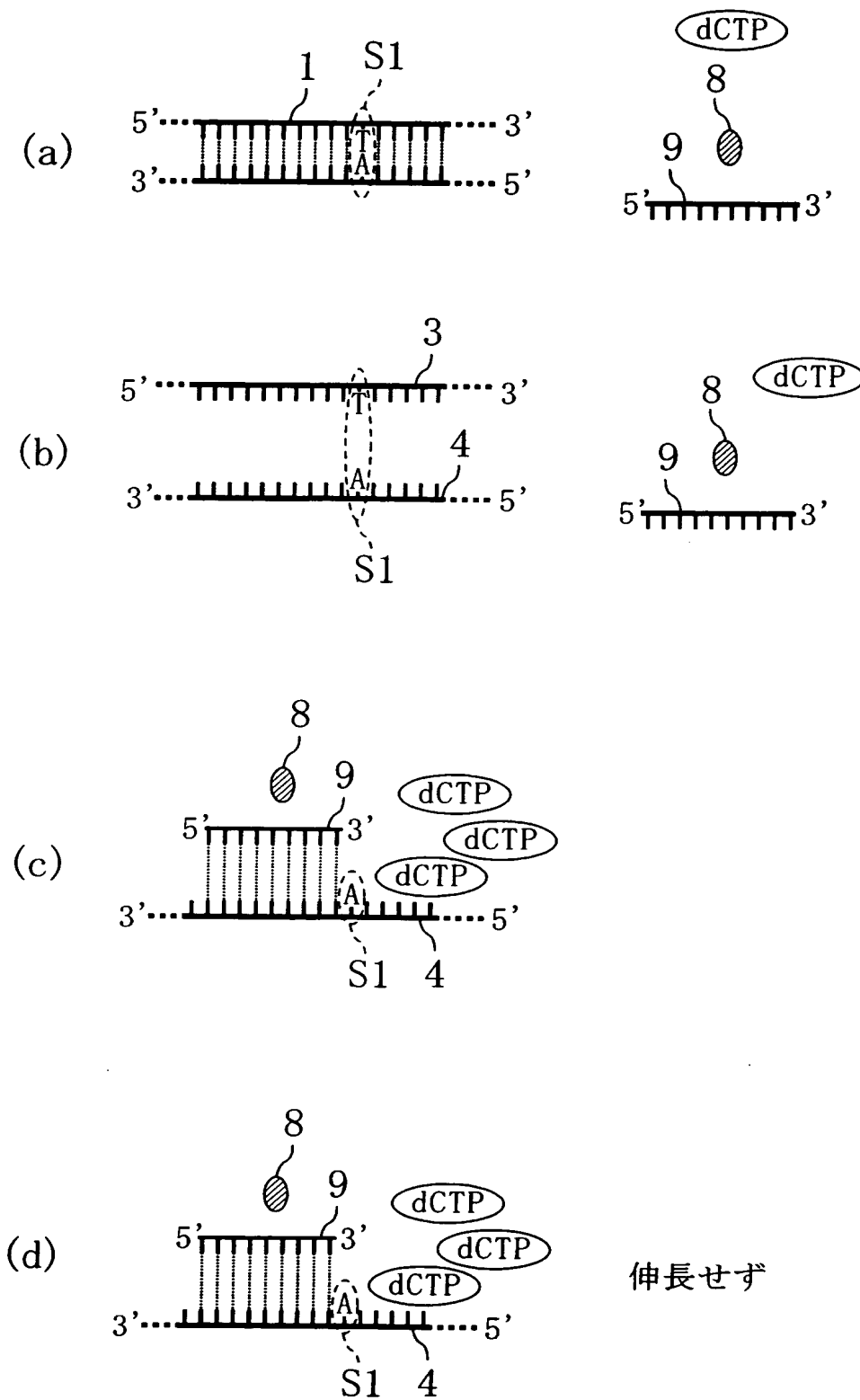
【図 19】



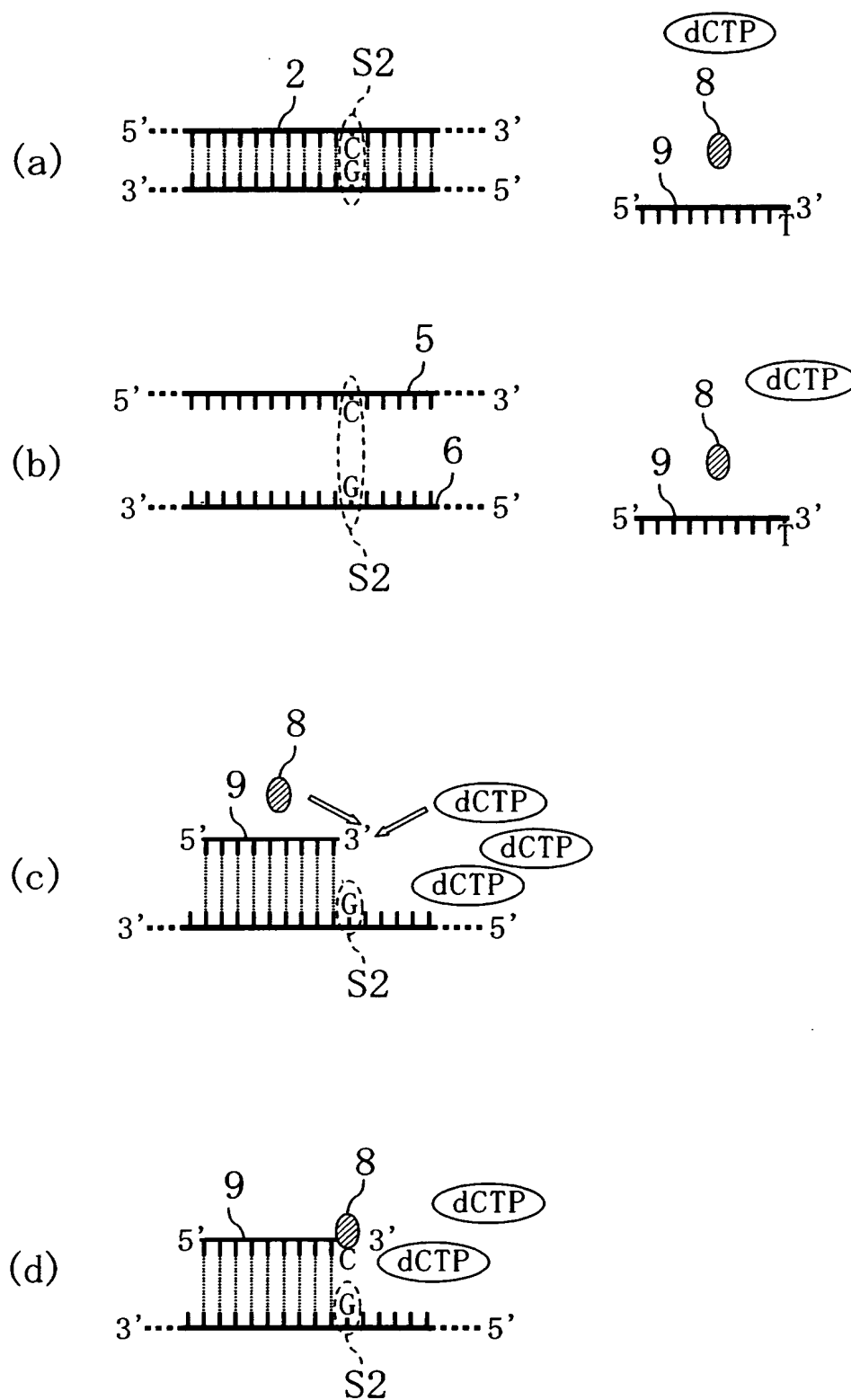
【図 20】



【図 21】



【図 22】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 ピロリン酸を測定する簡便な技術、ならびに標的核酸の検出および標的核酸の塩基配列の塩基種の判定技術を提供する。

【解決手段】 ピロリン酸の量を測定するために、 H^+ -ピロホスファターゼを用いる。図3は、 H^+ -ピロホスファターゼを模式的に表す図である。図3に示すように、 H^+ -ピロホスファターゼ11は、1分子のピロリン酸10から2分子のリン酸12を生成する加水分解反応に伴って、液胞膜13の外側から液胞膜13の内側に向けて H^+ を輸送する性質を有する。このため、 H^+ -ピロホスファターゼの酵素反応によって、液胞膜の内部では H^+ 濃度が増大し、液胞膜の外部では H^+ 濃度が減少する。本発明では、ピロリン酸を含む試料溶液を、植物細胞等から単離してきた液胞膜に内在している状態の H^+ -ピロホスファターゼに接触させる。この後、液胞膜の内側あるいは液胞膜の外側の H^+ 濃度の変化を測定する。このことによって、試料溶液中のピロリン酸の量を測定し、図1(d)および図2(d)に示すプライマー伸張反応の進行の差を解析することができる。プライマー伸張反応の進行の差を解析することによって、試料中に含まれるSNP部位の塩基種を判別できる。

【選択図】 図3

特願 2 0 0 2 - 2 8 8 8 3 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 8 2 1]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

氏 名

松下電器産業株式会社